

Funktionelle und strukturelle Untersuchungen an der Diisopropylfluorophosphatase aus *L. vulgaris*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Evdokia Katsemi
aus Athen

Frankfurt am Main, 2003
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Rüterjans
2. Gutachter: Prof. Dr. V. Dötsch

Tag der Disputation:

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, für die Bereitstellung der hervorragenden technischen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit und für seine großzügige Förderung.

Herrn Dr. Christian Lücke danke ich herzlich für seine vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen sowie für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Günter Fritsch und Herrn Dr. Jürgen Köpke für die hervorragende Zusammenarbeit im "strukturellen" Bereich.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Frank Löhr für die Durchführung der NMR-Experimente und für die hilfsreichen Diskussionen betreffend der Interpretation dieser Ergebnisse, bei Herrn Dr. André Richardt, weil er die Messungen mit den anderen Substraten in Münster ermöglichte sowie bei Dr. Claudia Rittmeyer für die Durchführung der TXRF-Messungen.

Für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei zahlreichen Experimenten danke ich Frau Juliana Winkler, die es auch in den schwierigen Momenten schaffte, mich schnell wieder zum Lachen zu bringen.

Bei Frau Joana Kleinhaus, Frau Veronica Noskova, Herrn Dr. Dirk Beilke und Herrn Dr. Vladimir Rogov möchte ich mich für die zahlreichen Hilfestellungen bei experimentellen Problemen während dieser Arbeit ebenfalls bedanken. Außerdem danke ich Felix Dancea für seine Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen.

Sigrid Fachinger möchte ich dafür danken, daß sie mir bei organisatorischen Angelegenheiten immer sofort geholfen hat.

Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das gute Arbeitsklima.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meinen Freunden, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit mit allen Kräften unterstützten.

Inhalt

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Organophosphate und ihre enzymatische Dekontamination	1
1.2 Die Diisopropylfluorophosphatase (DFPase) aus <i>Loligo vulgaris</i>	6
1.3 Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 <i>E. coli</i> K12-Stämme.....	15
2.1.2 Plasmide.....	15
2.1.3 Oligodesoxyribonukleotide.....	15
2.1.4 Enzyme	16
2.1.5 Chemikalien	16
2.1.6 Standards.....	16
2.1.7 Geräte.....	16
2.1.8 Säulen-und Chromatographiematerialien	16
2.1.9 Sonstiges Material.....	16
2.2 Antibiotika, Medien und Puffer	17
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.3.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	17
2.3.2 Transformation.....	18
2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	18
2.3.4 Agarosegelelektrophorese.....	19
2.3.5 Bakterienstammhaltung	20
2.3.6 Verdau von DNA mit Typ II-Restriktionsendonukleasen	20
2.3.7 Präparation der DNA aus Agarosegelen.....	21
2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	21
2.3.9 Ethanolische Fällung der DNA.....	21
2.3.10 Zielgerichtete Mutagenese.....	22
2.3.11 DNA-Sequenzierung	23
2.4 Proteinchemische Methoden.....	23
2.4.1 Expression der DFPase in <i>E. coli</i>	23
2.4.2 Isotopenanreicherung der DFPase	24
2.4.3 Isolierung der DFPase aus <i>E. coli</i>	24
2.4.3.1 Isolierung der isotopenmarkierten DFPase	26
2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.4.5 Blau native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	28
2.4.6 Metallaustausch an der DFPase	29
2.4.6.1 Metallaustausch an ¹⁵ N-markierter DFPase	30
2.4.7 Kristallisation der DFPase	30
2.5 Kinetische Messungen.....	31

2.5.1	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DFPase	31
2.5.2	Nachweis der Protonen über die pH-Stat-Methode	32
2.5.3	Detektion der Fluoridionen	33
2.5.4	Bestimmung der spezifischen Aktivität	33
2.5.5	Kinetikmessungen an der DFPase	34
2.5.5.1	Theoretische Grundlagen	34
2.5.5.2	Substratkonzentrationsbestimmung	35
2.5.5.3	Durchführung der kinetischen Messungen	36
2.6	Spektroskopische Methoden	37
2.6.1	UV-Absorptionsspektroskopie	37
2.6.2	Totalreflektions-Röntgen-Fluoreszenzspektrometrie (TXRF)	37
2.7	NMR-Experimente	38
2.8	Strukturbestimmung und Verfeinerung der DFPase-Kristalle	39
2.8.1	Präparation und Vermessung der Kristalle	39
2.8.2	Aufnahme der Beugungsbilder	40
2.8.3	Datenanalyse	40
2.8.4	Strukturverfeinerung	41
3.	Ergebnisse und Diskussion	44
3.1	Charakterisierung der nativen Struktureigenschaften der DFPase-Mutanten mittels BN-PAGE	45
3.2	Untersuchung der Substratbindung und des katalytischen Mechanismus der DFPase durch zielgerichtete Mutagenese	49
3.2.1	Mutationen in der Ca-1-Bindungsstelle der DFPase	52
3.2.2	Untersuchung der Rolle von His287	60
3.2.2.1	Substitution des His287 gegen aromatische Reste	62
3.2.2.2	Substitution des His287 gegen aliphatische Reste	63
3.2.2.3	Substitution des His287 gegen polare Reste	64
3.2.3	Untersuchung der Rolle von Ser271	68
3.2.4	Mutationen zur Untersuchung der Rolle von Aminosäureresten in der Substratbindungstasche der DFPase	70
3.2.4.1	Effekte von Ladung und Größe verschiedener Seitenketten	71
3.2.4.2	Untersuchung der Rolle von Phe173	74
3.2.5	Untersuchung des Ca-2-Liganden Asp232	76
3.2.6	Einfluss des Wasserstoffbrückennetzwerks im zentralen Tunnel der DFPase auf die Katalyse	84
3.2.6.1	Die Rolle von Gln77	91
3.2.6.2	Die Rolle von Gln304	93
3.2.6.3	Die Rolle von Asn272 und Asp121	93
3.2.6.4	Die Rolle von Asn237	96
3.2.7	Erzeugung von Doppelmutanten zur Erhöhung der DFPase-Aktivität gegenüber DFP	96
3.3	Suche nach Inhibitoren der DFPase	98
3.4	Kinetische Messungen	101
3.4.1	Kinetische Messungen an DFPase-Mutanten mit DFP als Substrat	103
3.4.2	Kinetische Messungen der Wildtyp-DFPase mit anderen Substraten	106
3.5.	Metallaustausch in der DFPase	111

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Einbau zwei- und dreiwertiger Metallionen	111
3.5.2	Einbau paramagnetischer Metallionen für NMR-spektroskopische Untersuchungen	114
3.6	Ausblick	116
4.	Zusammenfassung	118
5.	Literaturverzeichnis	120
6.	Anhang.....	129
6.1	Oligodesoxyribonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese	129
6.2	Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung	133
6.3	Enzyme	133
6.4	Chemikalien	134
6.5	Standards.....	135
	DNA-Molekulargewichtsmarker	135
	Protein-Molekulargewichtsmarker	136
	Kits	136
6.6	Geräte	136
6.7	Säulen- und Chromatographiematerialien	138
6.8	Sonstiges Material	139
6.9	Antibiotika, Medien und Puffer	140
6.9.1	Antibiotika-Stammlösungen	140
6.9.2	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	140
	S.O.C.-Medium.....	140
	LB-Medium (Lurie-Bertani-Medium)	140
	TB-Medium (Terrific-Broth-Medium)	140
	M9-Medium (Glucose-Minimalmedium)	141
6.9.3	Medien für die Anreicherung mit ^2H , ^{13}C und/oder ^{15}N	141
	^{15}N -Medium	141
	$^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -H ₂ O-Medium	141
	$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Medium.....	142
6.9.4	Puffer	142
	G150-Puffer	142
	SDS Laufpuffer (TGS-Laufpuffer).....	142
	BN-PAGE - Kathodenpuffer	142
	BN-PAGE – Anodenpuffer.....	143
	BN-PAGE – Gelpuffer	143
	Eichpuffer für die Fluorid-Elektrode: 10^{-5} M NaF	143
	Eichpuffer für die Fluorid-Elektrode: 5×10^{-3} M NaF	143

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
AOX1	Alkoholoxidase 1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Da	Dalton
DFPase	Diisopropylfluorophosphatase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G150-Puffer	10 mM Tris/HCl, 2mM CaCl ₂ , pH 7,5
H ₂ O _{milli}	über Millipore Filtrationsanlage gereinigtes Wasser
IUMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
<i>L. vulgaris</i>	Loligo vulgaris
<i>L. pealei</i>	Loligo pealei
<i>L. opalescens</i>	Loligo opalescens
MCAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MWCO	Molecular weight cut off
NTA	Nitrilotriessigsäure
OPA	Organophosphat-Anhydrase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PON1	Humanserum Paraoxonase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

Abkürzungsverzeichnis

PTE	Phosphotriesterase
<i>P. pastoris</i>	Pichia pastoris
<i>P. diminuta</i>	Pseudomonas diminuta
RMSD	Root Mean Square Deviation
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	Saccharomyces cerevisiae
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
Tris	Tris(hydroxymethyl)-methylamin
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Organophosphate und ihre enzymatische Dekontamination

Organophosphate, sowie –phosphonate und –phosphonothionate gehören zu der Verbindungsklasse der organischen Phosphorverbindungen (Holmstedt, 1963). Obwohl die Synthese des ersten Organophosphats, des Tetraethylpyrophosphats, durch den Chemiker Philippe de Clermonte im Jahr 1854 erfolgte, wurde die toxische Wirkung dieser Verbindungen erst in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts erkannt. Organophosphate wurden zunächst aufgrund ihrer insektiziden Wirkung als Pflanzenschutzmittel betrachtet (Lange & von Krüger, 1932). Schrader und Mitarbeiter haben anschließend unterschiedliche Organophosphate wie Paraoxon, Parathion, Diisopropylfluorophosphat (DFP), Sarin, Soman und Tabun synthetisiert (Schrader, 1963). Aufgrund der hohen Toxizität einiger dieser Organophosphate wurden in den fünfziger und sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts große Mengen dieser Verbindungen als chemische Kampfstoffe hergestellt (Stark, 1984). Seit dem Abkommen zur Vernichtung chemischer Waffen von 1993 sind diese Vorräte jedoch gänzlich unschädlich zu machen (Zhang et al., 1999).

Organophosphate inhibieren irreversibel verschiedene Proteine, indem sie mit Serinresten im aktiven Zentrum dieser Proteine reagieren (Aldrige & Reiner, 1972; Schumacher, 1986). Dabei beruht die toxische Wirkung dieser Verbindungen vor allem auf der Störung der Nervenleitung infolge der irreversiblen Inhibition der Acetylcholinesterase (Heath, 1961; Mounter, 1963; Stark, 1984). Aber auch andere Serinesterasen, wie Serinproteasen und Lipasen werden durch die Organophosphate gehemmt (Karalliedde, 1989).

Mazur entdeckte 1946 im Blutplasma von Kaninchen und Menschen ein Enzym, welches in der Lage ist die Phosphor-Fluor-Bindung des DFP zu hydrolysieren und somit diese Substanz zu detoxifizieren (Mazur, 1946). Seitdem wurden derartige Enzyme, die organische Phosphorverbindungen spalten können, in zahlreichen Organismen gefunden. Die auch als OPA-Anhydrasen ("organophosphoric acid anhydrases"; Hoskin, 1990)

Einleitung

bezeichneten Enzyme wurden bisher in den Organen und Seren des Menschen (Aldrige, 1953; La Du, 1992; Li et al., 1995; Sogorb et al., 1998), in zahlreichen anderen Säugetieren wie Maus, Ratte, Kaninchen und Schwein (Zech & Zürcher, 1973; Storkebaum, 1975; Kao et al., 1985; Little et al., 1989), in Bakterien (Attaway et al., 1987; Pogell et al., 1991, Hoskin et al., 1984; Chettur et al., 1988; DeFrank, 1991), in eukaryotischen Einzellern wie *S. cerevisiae* (Hoskin et al., 1984) und *Tetrahymena thermophila* (Landis, 1986, 1987), in Insekten (Mouchés et al., 1987), Muscheln (Anderson et al., 1988), Tintenfischen (Hoskin et al., 1972) und Vögeln (Hoskin et al., 1999) aber auch in Pflanzen (Hoskin et al., 1999; Lockrigde et al., 1997) nachgewiesen. Außerdem konnte die Funktion der humanen Butyrylthiocholinesterase mittels gezielter Mutagenese so verändert werden, dass das modifizierte Enzym in der Lage ist, Organofluorophosphate wie Sarin zu hydrolysieren, anstatt wie das Wildtyp-Enzym von diesen Verbindungen irreversibel inhibiert zu werden (Broomfield et al., 1999; Lockrigde et al., 1997; Millard et al., 1998).

Die Organophosphate scheinen aufgrund ihrer größtenteils synthetischen Natur keinesfalls die natürlichen Substrate der OPA-Anhydrasen zu sein. In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen bezüglich der physiologischen Rolle dieser Enzyme durchgeführt. Es wurde allerdings auch angenommen, dass einige der OPA-Anhydrasen im Verlauf der Evolution zum Schutz vor natürlichen Organophosphaten entstanden sind (La Du et al., 1999), z. B. produziert das Cyanobakterium *Anabena flos-aquae* ein neurotoxisches Organophosphat. Aufgrund der artifiziell erzeugten Hydrolyse von Organophosphaten durch die mutierte humane Butyrylthiocholinesterase (s.o.) kann auch eine evolutionäre Verwandtschaft einiger OPA-Anhydrasen mit den Serinesterasen nicht ausgeschlossen werden. Außerdem wurde eine Beteiligung von OPA-Anhydrasen am Phosphor- bzw. Phosphonolipid-Stoffwechsel beschrieben (Landis et al., 1985).

Über die Serum-Paraoxonase aus Säugern (PON1) wurde beschrieben, dass sie ein Hauptbestandteil der HDL-Partikel ist und sich an der Inaktivierung von toxischen Produkten beteiligt, die im Verlauf der Oxidation von Lipidkomponenten durch den LDL-Komplex entstehen (Josse et al., 1999a; La Du et al., 1999). Außerdem wurde eine

Einleitung

Beteiligung von PON1 an der Aktivierung des Prodrugs Prulifloxacin nachgewiesen (Tougou et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass die aus Mensch und Kaninchen isolierten OPA-Anhydrasen zur Gruppe der Lactonasen gehören. Der N-terminale Bereich der aus humanem Serum isolierten Homocystein-Thiolactonase ist mit der N-terminalen Sequenz der OPA-Anhydrase aus humanem Serum identisch (Jakubowski, 2000). In einer weiteren Studie konnte die Lactonase-Aktivität der PON1 anhand der Spaltung von Glucocorticoid- γ -Lactonen bestätigt werden (Biggadike et al., 2000). Dagegen sind die aus verschiedenen *Alteromonas*-Spezies isolierten OPA-Anhydrasen funktionell und strukturell homolog zu einer Prolidase (Cheng et al., 1996a; Cheng et al., 1997). Dieses Enzym hydrolysiert Dipeptide mit einem C-terminalen Prolin-Rest, was darauf schließen lässt, dass die OPA-Anhydrase aus *Alteromonas* am Peptidmetabolismus beteiligt ist (Cheng et al., 1996b). Weiterhin zeigt ein Fragment einer aus Mausleber isolierten OPA-Anhydrase Sequenzidentität mit dem Senescence-Marker-Protein (Billecke et al., 1999).

Wie aus den erwähnten Beispielen ersichtlich, erfüllen unterschiedliche OPA-Anhydrasen vermutlich vollkommen unterschiedliche physiologische Funktionen. Somit können sie keiner bestimmten Enzymklasse zugeordnet werden. Heute werden die OPA-Anhydrasen nach der *IUMB* Nomenklatur benannt (Reiner, 1993; Walker, 1993) und in der Gruppe der Phosphotriesterasen (PTE) (EC 3.1.8) zusammengefaßt. Die Phosphotriesterhydrolasen werden entsprechend ihrer Substratspezifität in zwei Subklassen unterteilt, und zwar die Aryldialkylphosphatasen oder Paraoxonasen (PON) (EC 3.1.8.1) und die Diisopropylfluorophosphatasen (EC 3.1.8.2). Dabei sind Erstere in der Lage Aryldialkylphosphate wie z. B. Paraoxon zu hydrolysieren, während die DFPasen Phosphoanhydridbindungen wie P-F im DFP bzw. P-CN im Tabun spalten können.

Die Gruppe der DFPasen wird weiterhin aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer physikalischen Eigenschaften in Squid-Typ- und Mazur-Typ-DFPasen unterteilt (Hoskin et al., 1984). Mazur-Typ-DFPasen besitzen ein Molekulargewicht zwischen 40 und 96 kDa (Kao et al., 1985; Landis et al., 1985, 1986 & 1987), werden durch das Insektizid Mipaflox kompetitiv inhibiert (Hoskin, 1985) und bestehen meist aus mehreren Untereinheiten

Einleitung

(Storkebaum et al., 1975), welche durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Deshalb sind diese Proteine nur in bestimmten pH-, Ionenstärke- und Temperaturbereichen stabil. Außerdem erfolgt die Hydrolyse von Soman durch Mazur-Typ-DFPasen 2-20mal schneller als die Hydrolyse von DFP (Hoskin et al., 1984; Landis et al., 1986; Landis et al., 1987; Landis et al., 1985), wobei das weniger toxische Stereoisomer des Somans schneller hydrolysiert wird als das toxischere Isomer (Hong et al., 1999; Little et al., 1989). Zusätzlich wird die enzymatische Aktivität dieser Enzyme durch Zugabe von Manganionen um einen Faktor von 2-20 gesteigert (Storkebaum et al., 1975, Hoskin et al., 1984). Allerdings scheinen Manganionen keine Kofaktoren der Mazur-Typ-DFPasen zu sein, da sie in Gegenwart von EDTA unverändert aktiv sind (Wang et al., 1993; Lünzer, 1992).

Squid-Typ-DFPasen hingegen besitzen ein Molekulargewicht von ca. 35-40 kDa (Lünzer, 1992; Kopec-Smith et al., 1993; Wang et al., 1993), bestehen aus nur einer Untereinheit, hydrolysieren DFP mit ca. 4fach höherer Geschwindigkeit als Soman (Garden et al., 1975) und werden durch Mipafos nicht inhibiert (Hoskin et al., 1985, 1990). Wie Mazur-Typ-DFPasen hydrolysieren auch Squid-Typ-DFPasen ein Diastereoisomer des Somans schneller, jedoch ist unbekannt welches (Gay et al., 1978; Schulz et al., 1987). Im Gegensatz zu den Mazur-Typ-DFPasen bewirkt der Zusatz von Manganionen bei den Squid-Typ-DFPasen keine Steigerung der enzymatischen Aktivität. Unter Umständen wirkt Mangan sogar geringfügig inhibierend (Hoskin et al., 1984). Da Squid-Typ-DFPasen in Gegenwart von EDTA oder EGTA zu über 90% inhibiert werden (Hoskin et al., 1988), müssen diese Proteine Metall-Kofaktoren enthalten, welche essentiell für ihre Aktivität oder Stabilität sind.

Es sind jedoch DFPasen gefunden worden, welche die Eigenschaften beider Subklassen aufweisen. Somit ist eine eindeutige Differenzierung aller in die Klasse der Diisopropylfluorophosphatasen gehörenden Enzyme in Mazur-Typ- oder Squid-Typ-DFPasen nicht möglich (Hoskin et al., 1984; Landis et al., 1987; Chettur et al., 1988).

Durch die von den OPA-Anhydrasen katalysierte Hydrolyse der Organophosphate wird deren toxische Wirkungsweise zerstört. Somit können diese Enzyme als Alternative zu den

Einleitung

bislang gängigen Dekontaminationsmethoden von Organophosphat-Altlasten, wie die Verbrennung bei hohen Temperaturen oder der Einsatz von Chemikalien, eingesetzt werden (Cheng et al., 1996; Workshop N. A. R., 1994). Allerdings erfordert eine solche praktische Anwendung von OPA-Anhydrasen die gentechnologische Produktion entsprechender Enzyme, da diese im natürlichen Organismus nur in geringen Mengen enthalten sind. Die DFPase aus *Loligo vulgaris* (s. Abschn. 1.2) und die Phosphotriesterase (PTE) aus *Pseudomonas diminuta* können nach unserem derzeitigen Kenntnisstand im Großmaßstab eingesetzt werden.

Die PTE gehört zu den am besten charakterisierten Enzymen dieser Proteinklasse. Die Struktur des Proteins konnte anhand von Röntgenstrukturuntersuchungen (Benning et al., 1994, 1995; Vanhooke et al., 1996), kinetischen Messungen (Lewis et al., 1988; Dumas & Raushel, 1990b; Caldwell et al., 1991c), chemischer Modifikation (Dumas & Raushel, 1990b) und zielgerichteter Mutagenese (Kuo et al., 1997; Banzon et al., 1995) aufgeklärt werden sowie ein Mechanismus für die Katalysereaktion aufgestellt werden. Demnach handelt es sich bei der enzymatisch aktiven Form der PTE um ein Dimer mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Die durch PTE katalysierte Hydrolyse von Organophosphaten ist eine S_N2 -Reaktion, bei der ein aktiviertes Wassermolekül das Phosphoratom des jeweiligen Substrats nukleophil angreift (Lewis et al., 1988). Die PTE hydrolysiert DFP, Sarin und Soman um eine bis zwei Größenordnungen langsamer als Paraoxon (Dumas et al., 1990a). Das aktive Zentrum des Proteins enthält zwei Zinkionen, welche vermutlich an der Katalyse durch Polarisierung der zu spaltenden Phosphor-Sauerstoff-Bindung des Paraoxons sowie durch Aktivierung des hydrolytischen Wassermoleküls beteiligt sind (Hong & Raushel, 1996). Weiterhin konnte die PTE mittels zielgerichteter Mutagenese so verändert werden, dass die Aktivität des Enzyms gegenüber DFP um mehr als eine Größenordnung erhöht wurde (Watkins et al., 1997).

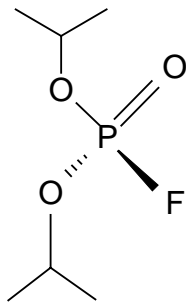
1.2 Die Diisopropylfluorophosphatase (DFPase) aus *Loligo vulgaris*

Die DFPase aus *L. vulgaris* gehört zur Gruppe der Squid-Typ-DFPasen. Zunächst wurde eine DFPase aus dem Tintenfisch *L. paelei* isoliert. Bereits im Jahr 1948 wurde festgestellt, dass die Konzentration von zugesetztem DFP im Axoplasma dieses Tintenfisches mehr als 1000fach geringer als im äußeren Medium war (Feld et al., 1948). Hoskin et al. (1966) konnten zeigen, dass dieses Phänomen auf der Wirkung eines DFP-hydrolysierenden Enzyms beruht, welches im Riesenaxon des Tintenfisches *L. paelei* enthalten ist. Später konnte die DFPase auch in den Kopf- und Stellarganglien sowie in den Speicheldrüsen und im Hepatopankreas von *L. paelei* lokalisiert werden (Hoskin et al., 1969a, 1971, 1972, 1982, 1983; Garden et al., 1975; Gay et al., 1979). Das Enzym weist eine hohe DFPase-Aktivität auf, besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5,2 und ein Molekulargewicht von 42 kDa (Garden et al., 1975; Kopec-Smith et al., 1993). Außerdem wird es bei Inkubation mit EDTA irreversibel gehemmt, was auf die Existenz von divalenten Kationen als Kofaktoren schließen lässt (Hoskin et al., 1988)

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die DFPase aus *L. vulgaris*, welche in der Lage ist, die Organophosphate DFP, Sarin (GB), Cyclohexylsarin (GF), Soman (GD) und Tabun (GA) (s. Abb. 1.1) zu spalten, wobei DFP mit einer dreifach höheren Geschwindigkeit als Soman und Sarin hydrolysiert wird. Die Enantiomeren des Sarins bzw. die vier Diastereomeren des Somans werden unterschiedlich schnell abgebaut, wobei es unklar ist, welches Diastereomer bzw. Enantiomer bevorzugt abgebaut wird. Paraoxon (E600) und VX werden durch das Enzym nicht hydrolysiert (Schulz, 1987, unveröffentlichte Daten).

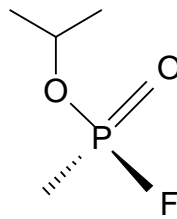
Erstmals wurde die DFPase aus *L. vulgaris* von W. Schulz (1987) in Anlehnung an das von Hoskin (1972) entwickelte Verfahren isoliert. Dabei wurden zunächst zwei Isoenzyme erhalten, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt geringfügig unterschieden (pI 5,0 bzw. 5,1). Das über SDS-PAGE bestimmte Molekulargewicht beider Isoenzyme betrug ca. 39 kDa. Die Untersuchungen von Schulz (1987) und Lünzer (1992) zeigten, dass das Enzym zumindest ein zweiwertiges Metallion, vermutlich Ca^{2+} , enthält, das entscheidend

Einleitung



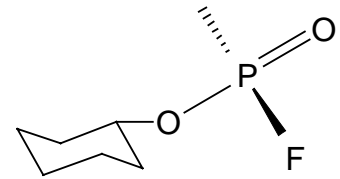
DFP

(Diisopropylfluorophosphat)



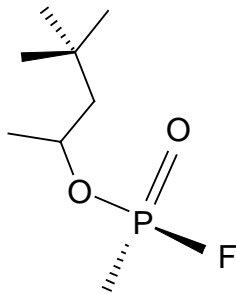
Sarin

(O-Isopropyl-methyl-fluorophosphonat)



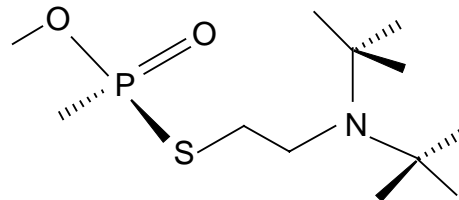
Cyclohexylsarin

(O-Cyclohexyl-methyl-fluorophosphonat)



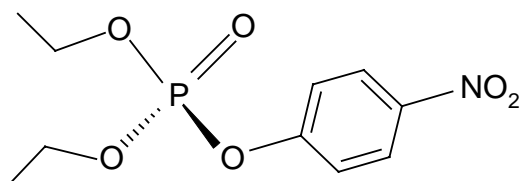
Soman

(O-1,2,2-Trimethylpropyl-methylfluorophosphat)



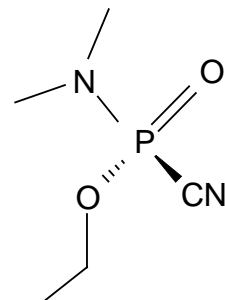
VX

(O-Ethyl-S-diisopropylaminoethyl-methylthiophosphonat)



Paraoxon (E600)

(Diethyl-p-nitrophenylphosphat)



Tabun

(Ethyl-N,N-dimethylamido-cyanphosphat)

Abb. 1.1: Struktur und Nomenklatur einiger Organophosphatverbindungen. Dargestellt sind die Substrate der DFPase aus *L. vulgaris*: DFP, Soman, Tabun, Sarin und Cyclohexylsarin. VX und Paraoxon werden hingegen nicht hydrolysiert.

Einleitung

zur Stabilisierung der Struktur beiträgt. Das Enzym ist sowohl in salzhaltigen und gepufferten Lösungen als auch in einer Vielzahl organischer Lösungsmittel stabil (Schulz et al., 1987; Dierl, 1999, unveröffentlichte Daten). Da Organophosphat-Lösungen stark sauer und lösungsmittelhaltig sind, jedoch die DFPase unterhalb vom pH 5,0 irreversibel denaturiert wird, ist hohe Stabilität eine unabdingbare Zielsetzung für den Einsatz der DFPase zur biologischen Dekontamination von Organophosphaten. Weiterhin verliert das Enzym seine Tertiärstruktur oberhalb vom pH 11,0 und bei Temperaturen über 55 °C.

Enzymkinetische Messungen zeigten, dass die Geschwindigkeit der DFP-Umsetzung zwar nur geringfügig, aber signifikant vom pH-Wert abhängt; die optimalen Umsatzraten wurden bei pH 7,5 erreicht (Schulz, 1987). Wie bei der Diisopropylfluorophosphatase aus *L. pealei* wurde das Molekulargewicht der DFPase aus *Loligo vulgaris* zunächst mit 26 kDa angegeben (Schulz, 1987; Lünzer, 1989). Erfolgt die Isolation der DFPase aus den Kopfganglien des Tintenfisches jedoch in Gegenwart des Proteaseinhibitors PMSF, wird ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 39 kDa erhalten (Lünzer, 1992). Demnach entsteht das Proteinfragment mit einer Größe von 26 kDa vermutlich durch einen proteolytischen Abbau des Proteins im Verlauf der Isolation.

Die ähnlichen physikalischen Eigenschaften der Diisopropylfluorophosphatasen aus den Tintenfischen *L. vulgaris* und *L. pealei* wiesen darauf hin, dass diese Enzyme strukturell ähnlich oder sogar identisch sind. Um dies zu überprüfen, wurden sie mittels monoklonaler, gegen die DFPase aus *L. pealei* gerichteter Antikörper analysiert (Dechamps et al., 1993). Dabei wurde festgestellt, dass die Enzyme zwar eine gewisse Homologie besitzen, aber nicht identisch sind (Lünzer, 1992; Dechamps et al., 1993).

Um das Enzym gentechnologisch produzieren zu können, war es zunächst erforderlich, die cDNA-Sequenz der DFPase aufzuklären. Obwohl beide DFPasen N-terminal blockiert waren (Lünzer, 1989), konnten Teile der Primärstruktur anhand von Bruchstücken des Proteins ermittelt werden (Lünzer, 1992). Anschließend wurde die mRNA aus den Kopfganglien von *L. vulgaris* isoliert und eine cDNA-Bank angelegt (Dierl, 1991; Lünzer, 1992). Ausgehend von den schon ermittelten Proteinfragmenten wurden DNA-Sonden synthetisiert, die für Hybridisierungsexperimente in der cDNA-Bank verwendet

Einleitung

wurden. Dies führte schließlich zu der erfolgreichen Aufklärung der cDNA-Sequenz eines der beiden Isoenzyme (Dierl, 1991, 1995; Junghans, 1995). Das DFPase-Gen besteht aus 942 bp und kodiert für insgesamt 314 Aminosäuren, was somit ein theoretisches Molekulargewicht von 35079 Da aufweist.

Die DFPase wurde zunächst in *E. coli* unter Verwendung eines T7-Promotors mit einer Expressionsrate von ca. 5 mg/l produziert (Stahl, 1996, unveröffentlichte Daten; Scharff, 1996). Die Benutzung von zwei unterschiedlichen Expressionssystemen unter Verwendung *E. coli* eigener Promotoren führte zu Expressionsraten bis zu ca. 200 mg/l. Mit *P. Pastoris* als Expressionssystem und Kontrolle der Expression durch den AOX1-Promotor wurden schließlich sogar Expressionraten bis zu 5 g/l erreicht (Scharff, 2000). Weiterhin zeigten Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse, dass das Enzym unter nativen Bedingungen in zwei Fragmente gespalten werden konnte, die nach gemeinsamer Rückfaltung über starke nicht-kovalente Wechselwirkungen verknüpft sind. Da diese Fragmente nur nach der gemeinsamen Rückfaltung tatsächlich enzymatische Aktivität aufwiesen, wurde angenommen, dass die DFPase aus einer einzigen Domäne besteht, die einen für Proteasen zugänglichen, flexiblen Bereich enthalten muß (Hartleib, 2000).

Die rekombinante DFPase weist ein Aktivitätsoptimum bei pH 8,9, 35 °C und 500 mM NaCl auf. Aufgrund von Temperatur-, pH- und Salzabhängigkeitsuntersuchungen der DFP-Hydrolyse konnte zunächst in Verbindung mit gezielter Mutagenese Histidin 287 eindeutig als ein für die Katalyse essentieller Rest identifiziert werden (Hartleib & Rüterjans, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die DFPase eine nieder- und eine hochaffine Calcium-Bindungsstelle enthält. Hierbei wurde nachgewiesen, dass das mit höherer Affinität gebundene Calciumion für die Stabilisierung der Struktur sehr wichtig ist (Hartleib et al., 2001). Mittels Gleichgewichtsdialyse konnte das niederaffin gebundene Calciumion gegen Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} ausgetauscht werden, ohne dass die Aktivität des Enzyms beträchtlich beeinflusst wurde. Mutationen an der Bindungsstelle des niederaffinen Calciumions führten jedoch zum Verlust dieses Calciumions und gleichzeitig zum Verlust der enzymatischen Aktivität der jeweiligen Mutanten, was den Schluß zuließ, dass das niederaffine Calciumion bei der Katalyse eine entscheidende Rolle spielt (Scharff et al., 2001a).

Einleitung

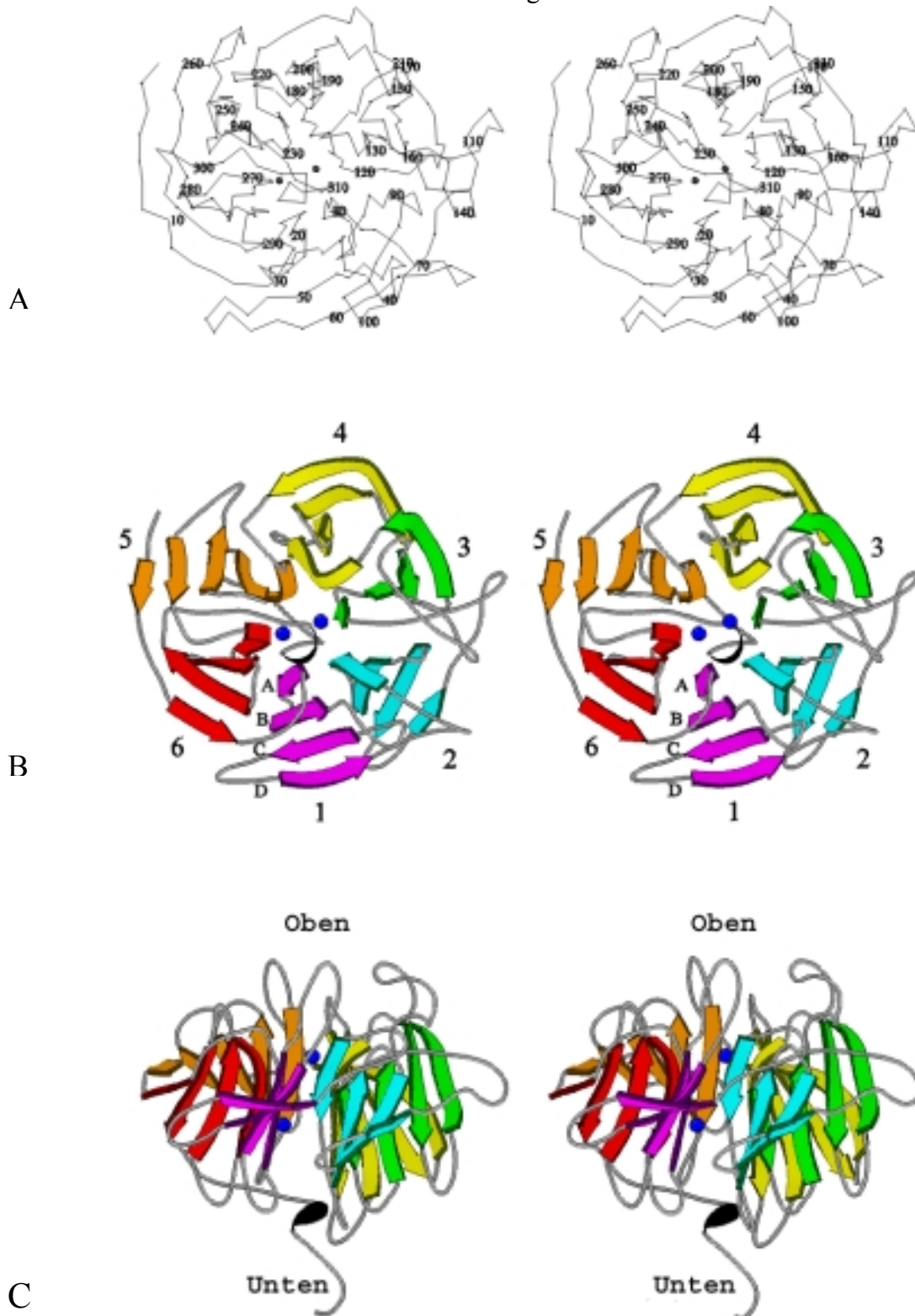


Abb. 1.2: Stereodarstellungen der Kristallstruktur der DFPase bei 1,8 Å Auflösung mit Hilfe des Programms MOLSCRIPT (Kraulis, 1991). **A.** Darstellung des Proteinrückgrates. Die Position jedes zehnten Restes ist numeriert. **B.** Nomenklatur des β -Propellers. Die einzelnen Module sind unterschiedlich eingefärbt und numeriert. **C.** Seitenansicht des Propellers. Die Farbkodierung der einzelnen Module entspricht der Farbkodierung in B. (Entnommen aus Scharff et al., 2001a.)

Einleitung

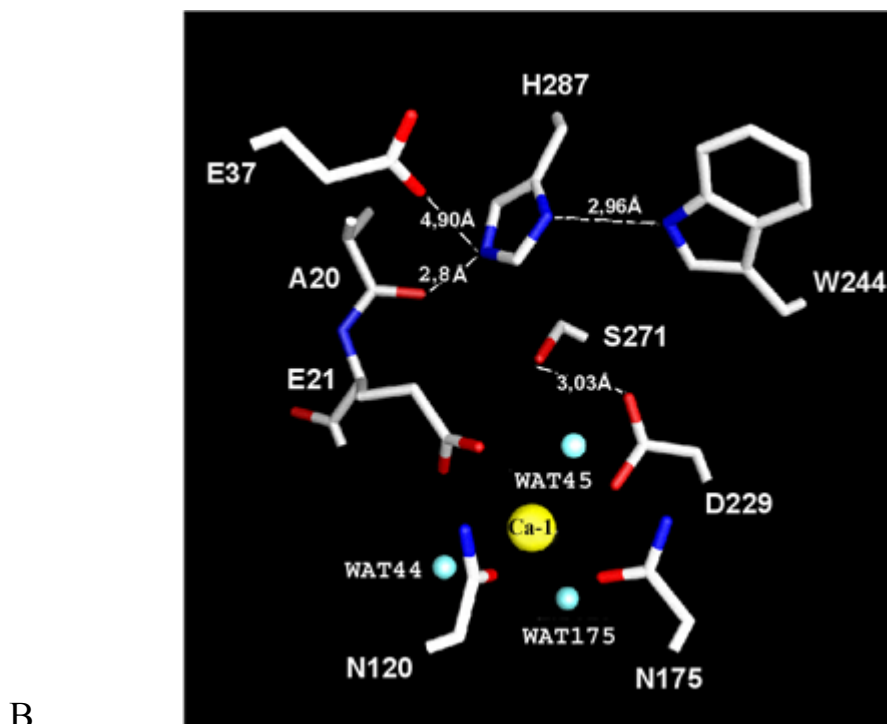
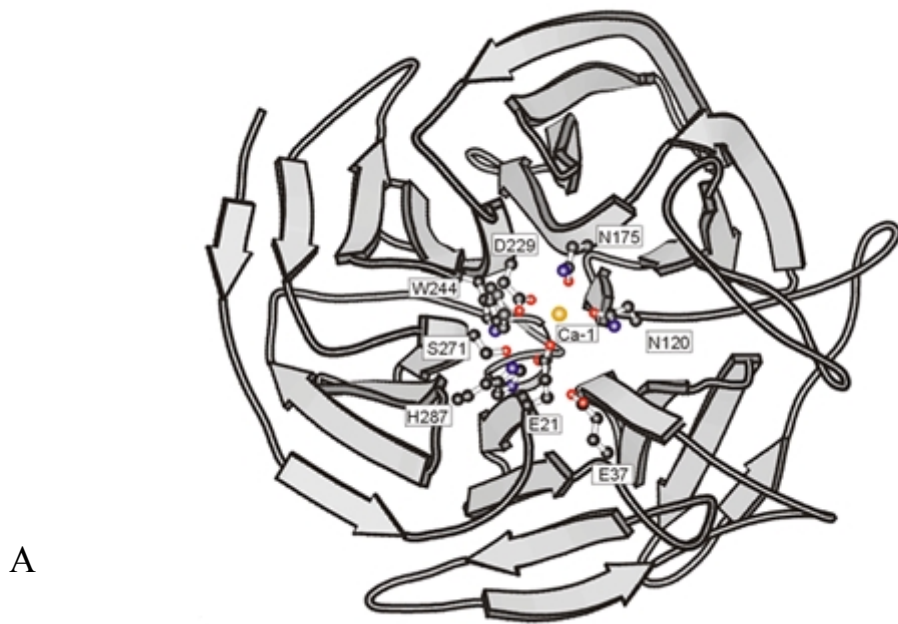


Abb. 1.3: **A.** Das aktive Zentrum der DFPase, dargestellt mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991). Ansicht der Struktur von oben mit Darstellung der vermutlich für die Katalyse essentiellen Reste. **B.** Eine weitere Darstellung des aktiven Zentrums der DFPase mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991). Die Wasserstoffbrücken sind über dünne Linien markiert und ihre Abstände in Angström angegeben (entnommen aus Scharff, 2000.)

Einleitung

Scharff und Mitarbeitern ist es gelungen, die rekombinante DFPase zu kristallisieren (Scharff et al., 2001b) und ihre Struktur bis zu einer Auflösung von 0,8 Å zu lösen (Scharff et al., 2001a; Koepke et al., 2003). Die DFPase weist ein sechsfaches β -Propellerfaltungsmotiv auf (s. Abb. 1.2), welches eine besondere Stabilität aufweist (Löhr et al., 2003). Die in der Literatur beschriebenen β -Propellerproteine besitzen überraschend viele Funktionen, von enzymatischer Katalyse und Signalmolekülen bis zur Ligandenbindung und -transport sowie Mediatoren von Protein-Protein-Interaktionen. Ungefähr die Hälfte der bekannten β -Propeller sind Enzyme und umfassen ein breites Spektrum an Reaktionen mit unterschiedlichen Substraten.

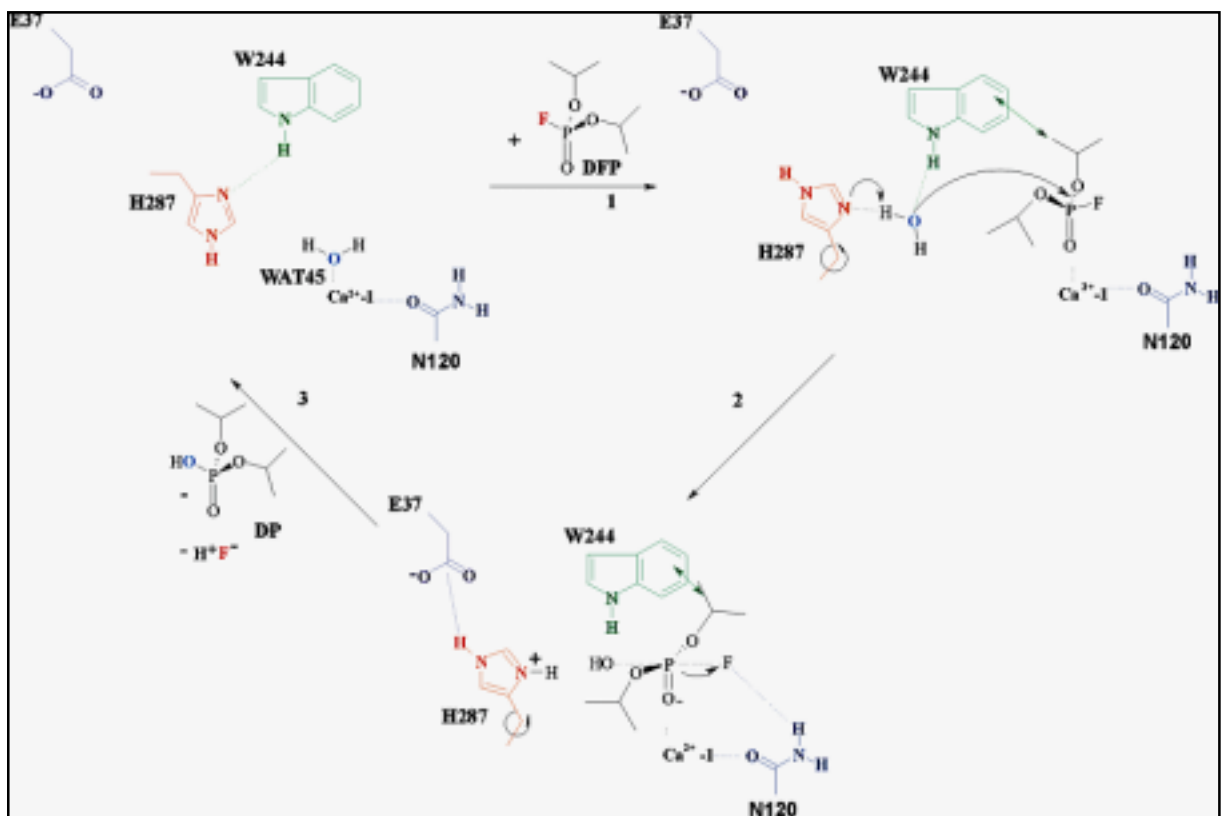


Abb. 1.4: Vorgeschlagenes Modell für die Hydrolysereaktion des DFP durch die DFPase. Im ersten Schritt wird das Substrat am aktiven Zentrum gebunden, das WAT45 verdrängt und die Wasserstoffbrücke zwischen His287 und Trp244 unterbrochen. Im zweiten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff durch das aktivierte Wassermolekül und dadurch die Ausbildung des Übergangszustands. Die Freisetzung des Fluoridions (F^-) und eines Protons (H^+) sowie die Wiederherstellung des Ausgangszustands erfolgen im Schritt 3 (Scharff et al., 2001a).

Einleitung

In der Kristallstruktur der DFPase konnten beide Calciumionen im zentralen Tunnel der β -Propellerstruktur lokalisiert werden. Weiterhin konnte das aktive Zentrum des Proteins anhand vom His287 identifiziert werden (s. Abb. 1.3). Mittels zielgerichteter Mutagenese des in der Nachbarschaft von His287 befindlichen Ser271 konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse des DFP nicht durch eine katalytische Triade von Serinproteasen, sondern offenbar durch ein nukleophiles Wassermolekül vermittelt wird. Die zielgerichtete Mutagenese von weiteren Resten in der Nachbarschaft des His287 erlaubte letztendlich die Aufstellung eines Modells für den Reaktionsmechanismus (s. Abb. 1.4). Hiernach erfolgt die Substratbindung über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem niederaffinen Calciumion und hydrophobe Wechselwirkungen mit Trp244. Als Folge der Substratbindung wird zum einen ein Wassermolekül verdrängt und zum anderen die His287-Seitenkette reorientiert. Eine Reorientierung des für die Katalyse als essentiell angenommenen Histidins wurde auch für die Phospholipase A₂ beschrieben, bei der ebenfalls ein Calciumion an der Hydrolyse des Substrats direkt beteiligt ist (Scott et al., 1990). Das His287 fungiert als Protonenakzeptor und aktiviert ein Wassermolekül, welches dann das Phosphoratom des Substrats nukleophil angreift. Es wird vermutet, dass die Koordination des Phosphoratoms im Übergangszustand trigonal bipyramidal ist, da eine derartige Anordnung bei der Hydrolyse von Phosphotriestern durch die PTE aus *P. diminuta* bereits nachgewiesen und generell für den Übergangszustand von Phosphotriestern während der enzymatischen Hydrolyse postuliert wurde (Caldwell et al., 1991a & 1991b). Anschließend erfolgt die Freisetzung von Flußsäure und Diisopropylphosphat aus der Bindungstasche des Enzyms sowie die Wiederherstellung des Ausgangszustands durch die Rückorientierung von His287 (Scharff et al., 2001a).

1.3 Zielsetzung

Basierend auf der von Scharff et al. (2000, 2001a) gelösten Kristallstruktur der DFPase und Mutagenesestudien waren einige der in der Substratbindungstasche befindlichen Aminosäurereste als essentiell bzw. wichtig für die Katalyse identifiziert worden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zunächst einige Mutanten dieser Reste kinetisch untersucht, um ihre Beteiligung an der Katalyse zu bestätigen. Desweiteren wurde mittels zielgerichteter

Einleitung

Mutagenese versucht, den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus weitergehend zu untersuchen und gegebenenfalls zu ergänzen, indem weitere an der Katalyse und an der Substratbindung beteiligte Reste identifiziert und ihre Rolle erläutert werden sollten. Da die Kristallisationsbedingungen sowie die Wildtypstruktur des Enzyms bekannt waren, sollte im Falle einer erfolgreichen Kristallisation der Mutanten ihre Struktur aufgeklärt und diese zum besseren Verständnis des Mechanismus der hydrolytischen Reaktion eingesetzt werden. Dasselbe Ziel wurde verfolgt, indem versucht wurde, einen stabilen Enzym-Substratkomplex zu erhalten.

Da die Hydrolyseeigenschaften der DFPase bezüglich der Substrate Soman, Sarin und Tabun bisher nur für das native Enzym beschrieben worden waren (Schulz et al., 1987), bestand eine weitere Aufgabe dieser Arbeit darin, die Katalysereaktion des rekombinanten Enzyms und seiner Varianten mit diesen Substraten kinetisch zu charakterisieren. Dies sollte zeigen, ob auch das gentechnisch hergestellte Enzym als Dekontaminationsmittel gegen diese Organophosphate eingesetzt werden kann.

Weiterhin sollten Bedingungen entwickelt werden, bei denen das niederaffin gebundene Calciumion gegen paramagnetische Metalle ausgetauscht werden kann. Im Falle eines erfolgreichen Einbaus dieser Metalle könnten isotonenangereicherte Proteinproben für NMR-Experimente hergestellt werden, welche strukturellen Untersuchungen dienen sollen.

Das gemeinsame Ziel all dieser Studien war ein besseres Verständnis des Hydrolysemechanismus, um gegebenenfalls noch wirkungsvollere Varianten der DFPase für die Dekontamination im technischen Großmaßstab entwickeln zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *E. coli* K12-Stämme

Stamm	Genotyp/Phänotyp
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻, [F', proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10 (tet^r)]</i> (Bullock et al., 1987), von Stratagene GmbH, Heidelberg
BL21	<i>F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm</i> von Stratagene GmbH, Heidelberg

2.1.2 Plasmide

pKKHisND	(Hartleib J., 2000)
----------	---------------------

2.1.3 Oligodesoxyribonukleotide

Die Oligodesoxyribonukleotide für DNA-Synthese, -Sequenzierung und Mutagenese wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, im 0,01-0,05 µmol-Maßstab synthetisiert. Nach der Synthese wurden die Oligodesoxyribonukleotide über *Reversed Phase* Chromatographie gereinigt und lyophilisiert.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 6.1 und 6.2 aufgelistet.

2.1.4 Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme sind im Anhang 6.3 aufgelistet.

2.1.5 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind im Anhang 6.4 aufgelistet.

2.1.6 Standards

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Standards und Kits sind im Anhang 6.5 aufgelistet.

2.1.7 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind im Anhang 6.6 aufgelistet.

2.1.8 Säulen-und Chromatographiematerialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Säulen- und Chromatographiematerialien sind im Anhang 6.7 aufgelistet.

2.1.9 Sonstiges Material

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sonstigen Materialien sind im Anhang 6.8 aufgelistet.

2.2 Antibiotika, Medien und Puffer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika, Medien und Puffer sind im Anhang 6.9 aufgelistet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Puffer und Medien, deren Zusammensetzung im nachfolgenden Text nicht explizit beschrieben ist, sind dem Abschn. 2.2.2 zu entnehmen. Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden an einer Sterilbank oder an der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt, damit das sterile Arbeiten gewährleistet war.

2.3.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Einführung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen erfordert, dass diese in einer transformationskompetenten Form vorliegen, so dass sie die Fremd-DNA aufnehmen können. Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1985).

Nach dieser Methode wurden 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *E.coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis gelagert, in zwei vorgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und geerntet (10 min, 4°C, 3000 g). Die sedimentierten Bakterienzellen wurden in je 7,5 ml kaltem TF-BI-Puffer (100 mM RbCl, 100 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin, 10 mM CaCl₂, 30 mM KAc, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert, eine Stunde auf Eis gelagert und erneut, wie oben angegeben, abzentrifugiert. Nach dem Aufnehmen der sedimentierten Zellen in insgesamt 4 ml

vorgekühltem TF-BII-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 7) wurde die Zellsuspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Transformation

100 µl auf Eis aufgetaute kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit 1-4 µl Plasmid-DNA (10-500 ng) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Fremd-DNA von den kompetenten Zellen wurde durch eine Hitzeschockbehandlung (42 °C, 45 sec) ermöglicht. Nach zweiminütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 400 µl vorgewärmtes S.O.C.-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Je nach Art des Transformationsansatzes wurden 100-300 µl der Bakterienlösung auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausgestrichen, die mit Ampicillin supplementiert waren (100 µg/ml). Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der unten aufgeführten Kits entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden die Zellen alkalisch lysiert (Birnboim & Doley, 1979) und die enthaltene Plasmid-DNA über Affinitätschromatographie mit Silikagelsäulen isoliert. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen.

Für analytische Zwecke wurde der "QIAprep Spin Plasmid" Kit verwendet. Mittels dieses Kits konnten aus 2 ml Übernachtskultur 2-8 µg Plasmid-DNA isoliert werden. Zur Herstellung möglichst reiner DNA für die Sequenzierung (s. Methode 2.3.11) wurde der "Qiagen Plasmid Mini" Kit verwendet, mittels dessen 2-4 µg Plasmid-DNA aus 2 ml Übernachtskultur isoliert werden konnten. Für die Isolierung von DNA im präparativen Maßstab wurde der "QIAfilter Plasmid Midi " Kit (ca. 100-200 µg DNA aus 50 ml Übernachtskultur) verwendet.

Die Bestimmung geringer DNA-Mengen erfolgte über Agarosegelelektrophorese durch den Vergleich mit einem DNA-Massenstandard. Die Reinheit und Konzentration größerer DNA-Mengen wurde photometrisch über die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Extinktion von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Der Quotient aus E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit einer DNA-Lösung. Reine DNA weist ein Verhältnis E_{260}/E_{280} von 1,8-2 auf (Berger, 1975).

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Doppelsträngige DNA wurde zu analytischen oder präparativen Zwecken mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Konzentration und Eigenschaften der für die Gele verwendeten Agarose richteten sich nach Größe und Verwendungszweck der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Für Fragmente im Bereich von 700 bp bis 5000 bp betrug die verwendete Agarosekonzentration 0,9%, für Fragmente im Bereich von 1000 bp bis 10000 bp betrug sie 2,0%. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) verwendet. Falls im Anschluß an die Agarosegelelektrophorese die DNA über enzymatischen Verdau aus dem Gel isoliert werden sollte, wurde Low Melting Point-Agarose verwendet.

Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V über 60 min durchgeführt. Anschließend wurde das Agarosegel 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µl/ml) gefärbt und auf dem UV-Transilluminator über die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids bei 254 nm untersucht. Größe und Menge der einzelnen DNA-Fragmente konnten mit Hilfe von DNA-Größen- und Massenstandards abgeschätzt werden. Es erfolgte eine photographische Dokumentation der Gele.

2.3.5 Bakterienstammmhaltung

Bakterienstämme wurden in Form von Glycerin-Dauerkulturen gelagert. 1 ml einer 5 ml-Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstamms wurde in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 450 µl einer 50% sterilen Glycerinlösung wurde die Suspension gemischt und bei –80 °C gelagert.

Bakterienstämme, die bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden sollten, wurden auf LB-Agarplatten kultiviert. Hierfür wurden die entsprechenden Bakterien aus einer Glycerindauerkultur des Bakterienstammes auf eine LB-Agarplatte überführt, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt, und anschließend ca. 12 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.6 Verdau von DNA mit Typ II-Restriktionsendonukleasen

Zur Erzeugung kompatibler Enden von Vektor- und Fragment-DNA für Ligationsreaktionen wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen des Typs II gespalten. Für einen analytischen Verdau (10-20 µl Gesamtvolumen) wurden 50 - 250 ng DNA mit 0,5 - 1 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease versetzt, wobei die vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer verwendet wurden. Für einen präparativen Verdau (60 – 80 µl Gesamtvolumen) wurden 10 - 20 µg der entsprechenden DNA-Lösung mit 1 - 2 U Restriktionsendonuklease pro µg DNA versetzt. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen wurden die empfohlenen, optimalen Pufferbedingungen gewählt; bei Inkompatibilität der Enzyme erfolgte zwischen den Spaltungsreaktionen eine Ethanolfällung (s. Abschn. 2.3.9) (Shapiro,1981).

Die Ansätze des analytischen Restriktionsverdaus wurden für 1 Stunde, die des präparativen Restriktionsverdaus für 4 - 6 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 65 °C hitzedenaturiert zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme.

2.3.7 Präparation der DNA aus Agarosegelen

Falls das mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragment isoliert werden sollte, wurde es mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein tariertes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die anschließende Präparation der DNA aus dem Agarosegel wurde mit dem "QIAquick Extraction"-Kit durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen.

2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die hier verwendete T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung von Phosphordiesterbindungen zwischen der freien Phosphatgruppe des 5'-Endes mit der Hydroxylgruppe des Zuckers am 3'-Ende von DNA-Strängen. Damit eine Religation des über Restriktionsverdau linearisierten Vektors verhindert wird, wurde er mit alkalischer Phosphatase behandelt (Sambrook et al., 1989).

Für den Ligationsansatz, dessen Volumen nicht mehr als 10 µl betrug, wurden jeweils 80 – 100 ng Vektor-DNA mit der zu insertierenden DNA in molaren Verhältnissen von 1:1 – 10 versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 45 °C und anschließendem Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze mit 1 µl des vom Hersteller beigelegten 10x Puffer (660 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5) versetzt. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase eine bis zwei Stunden bei 15 °C inkubiert. Die entsprechenden Zellen wurden danach mit 2-4 µl des Ligationsansatzes transformiert.

2.3.9 Ethanolische Fällung der DNA

Die ethanolische Fällung dient zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA. Hierfür wurde die DNA-enthaltende Probe mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6) und 2 Volumina eiskaltem Ethanol (100%) versetzt. Nach sorgfältigem Mischen

wurde die Lösung 10 Minuten auf Eis gelagert und anschließend 30 Minuten zentrifugiert (4°C, 12000 g). Der wäßrige Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 100 µl Ethanol (70% (v/v)) gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) getrocknet und in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen (Ito et al.1991)

2.3.10 Zielgerichtete Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen in spezifische DNA-Sequenzen erfolgte mittels des "QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis" Kits. Die gewünschten Mutationen wurden durch Amplifikation der Plasmid-DNA mit *PfuTurbo*™ DNA-Polymerase mit Hilfe von mutagenen, komplementären Oligodesoxyribonukleotiden eingeführt. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden 10 ng des das DFPase-Gen enthaltenden Plasmids als Templat in einem 50 µl Reaktionsansatz mit 5 µl 10x Puffer, 200 µmol dNTPs, 100 ng der entsprechenden Mutageneseprimer und 2,5 U *PfuTurbo*™ DNA-Polymerase eingesetzt. Parallel wurde ein analoger Ansatz mit der vom Hersteller beigefügten Plasmid- und Primer-DNA zur Überprüfung der Mutageneseeffizienz durchgeführt.

Nach einer einmaligen Denaturierung der parentalen Plasmid-DNA für 45 Sekunden bei 95 °C erfolgte die Amplifikation der DNA in 15 Zyklen, die aus folgenden Schritten bestand:

Zyklus	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Reaktion
1	45	95	Denaturierung parentaler Plasmid-DNA
2 – 15	30	94	Denaturierung doppelsträngiger DNA
	60	55	Anlagerung (Annealing) der Primer
	720	68	DNA-Synthese (Elongation)

Anschließend wurde die als Templat eingesetzte Plasmid-DNA mit *DpnI*, welches gezielt die methylierte, parentale DNA abbaut, durch einstündige Inkubation bei 37 °C verdaut. Es erfolgte eine ethanolische Fällung der mutierten Plasmid-DNA zur Reinigung und Aufkonzentrierung (s. Abschn. 2.3.9). Das DNA-Präzipitat wurde in 5 µl Tris/HCl-Puffer

(10 mM, pH 8,0) aufgenommen und in 100 µl XL1-Blue kompetente Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Bakterienkolonien wurde isoliert (s. Abschn. 2.3.3) und sequenziert (s. Abschn. 2.3.12).

2.3.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von neuen DNA-Konstrukten sowie nach der zielgerichteten Mutagenese basiert auf der Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleotide in einer linearen Polymerase-Kettenreaktion, welche nach ihrem zufälligen Einbau in die DNA an der eingebauten Position einen Kettenabbruch als Folge haben.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des "Taq DyeDesoxyTM Terminator Cycle Sequencing" Kits entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Scientific Research & Development GmbH, Oberursel, durchgeführt.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Expression der DFPase in *E. coli*

Die Expression der DFPase verläuft mit Hilfe des pKKHC-Expressionsvektors und basiert auf der Verwendung des *E. coli* eigenen *trc*-Promotors, welcher unter Kontrolle des *lac*-Repressors steht und durch Zusatz von IPTG induziert werden kann (Brosius et al., 1985; Amann & Brosius, 1985). Die Verwendung anderer bakterieller Expressionssysteme führte überwiegend zur Bildung von Einschußkörpern. Zur Vereinfachung der Aufreinigungsprozedur wurde am N-Terminus der DFPase eine aus sechs Histidin-Resten bestehende Oligohistidindomäne (His-Tag) eingeführt. Die Expressionsrate der Wildtyp-DFPase im pKKHC-Vektor liegt in TB-Medium bei ca. 200 mg/l. (Hartleib, 2000).

Das Plasmid pKKHisND wurde in *E. coli* BL21-Zellen transformiert (s. Abschn. 2.3.2). Mit den erhaltenen Bakterienkolonien wurden 1000 ml TB-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, auf eine OD₆₀₀ von 0,05-0,07 inokuliert und bei 37 °C (30 °C im Falle der N120D-Mutante) inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8 wurde die Expression neben der erneuten Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin durch Zugabe von 1 mM IPTG, induziert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht (12 – 20 h) bei 30 °C im Schüttler inkubiert und am nächsten Morgen geerntet (12000 g, 20 min, 4 °C). Die Zellen wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20 °C gelagert.

2.4.2 Isotopenanreicherung der DFPase

Die Expression der DFPase in isotope markiertem Medium erfolgte ähnlich der Expression in nichtmarkiertem Medium (s. Abschn. 2.4.1). Da die Auswirkungen der Isotopenanreicherung auf das Zellwachstum erheblich sind, wurde das Medium gleich zu Beginn auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert.

2.4.3 Isolierung der DFPase aus *E. coli*

Das Experiment wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, soweit nicht anders beschrieben. Alle für die Proteinisolierung verwendeten Puffer wurden vor Verwendung sterilfiltriert (0,2 µm) und 15 – 30 Minuten entgast.

Die Isolierung der mit einem *His-Tag* versehenen DFPase aus *E. coli* bis hin zur homogenen Proteinlösung erfolgte durch eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Material (Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (MCAC)), eine Rechromatographie an Ni²⁺-NTA-Material nach Thrombin-Verdau zur Abspaltung des *His-Tags* und eine Ionenaustauschchromatographie (Hartleib, 2000).

Zunächst wurden die aus 1 l Bakterienkultur stammenden, bei – 20 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und in 30 ml MCAC-Puffer A (G150-Puffer, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) resuspendiert. Nach Zusatz von 1 mg/ml Pefabloc® wurden die Zellen durch

Ultraschall (10 x 15 Pulse, 200 W, Schwingsonde 5T), nach den 15 Pulsen jeweils eine einminütige Abkühlung auf Eis) aufgeschlossen und das Zellysat zentrifugiert (40000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit einem Spritzefilter (0,8 µm und 0,45 µm) filtriert und auf die mit MCAC-Puffer A äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Säule mit Hilfe eines 50 ml fassenden Superloops aufgetragen. Vor dem Auftragen wurde die in "Stripping Puffer" (100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) gelagerte Ni²⁺-NTA-Säule (Säulenkörper: XK 16/20, Säulenmaterial: 10 - 15 ml, Flußrate: 2 ml/min) nacheinander mit 30 ml H₂O_{milli} und 30 ml "Charge Puffer" (50 mM NiSO₄) gespült und mit 30 ml MCAC-Puffer A äquilibriert.

Nach dem Auftragen des Zellysats wurde die Säule mit 7% MCAC-Puffer B (G150-Puffer, 300 mM Imidazol, 500 mM NaCl) gespült. Das über das *His-Tag* an das Ni²⁺-NTA-Material gebundene Protein wurde mit 100% MCAC-Puffer B eluiert. Anschließend wurde die Proteinlösung mittels einer Druckfiltrationszelle (YM10 Membran) oder durch eine Dialyse gegen 5 l G150-Puffer bei 4 °C umgepuffert. Die Abspaltung der N-terminalen Oligohistidindomäne erfolgte in "Cleavage Puffer" (25 mM CaCl₂, 1,5 M NaCl, 200 mM Tris/HCl, pH 8,4) durch Zugabe von Thrombin (3 – 5 U/mg Protein). Nach 6 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur bzw. 12 Stunden Inkubation bei 4 °C wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe verdünnter HCl auf 7,4 eingestellt und Pefabloc® (1 mg/ml) zugegeben, damit das Thrombin inaktiviert wird. Anschließend wurde die Proteinlösung zentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C) und sterilfiltriert (Spritzenfilter: 0,45 und 0,2 µm) und erneut auf die mit MCAC-Puffer A äquilibrierte Ni²⁺-NTA Säule aufgetragen, um unvollständig verdautes Protein, welches die Oligohistidindomäne noch trägt, sowie andere kontaminierende Protein, die an die Säule binden, abzutrennen. Das Protein ohne *His-Tag* befand sich in dem Durchbruch, welcher auch weiterverarbeitet wurde, während das Eluat verworfen wurde.

Nach dem Austausch des Puffers mittels einer Druckfiltrationszelle (YM10 Membran) oder durch Dialyse gegen 5 l G150-Puffer bei 4 °C wurde die Proteinlösung erneut sterilfiltriert (Spritzenfilter: 0,2 µm) und auf eine Q-Sepharose HP-Säule (Säulenkörper: XK 16/20, Säulenmaterial: 10 - 15 ml, Flußrate: 2 ml/min) aufgetragen. Die in 20% Ethanol aufbewahrte Q-Sepharose HP-Säule wurde zuerst mit 30 ml H₂O_{milli} gespült und

anschließend mit 30 ml IEC-Puffer B (G150-Puffer, 1 M NaCl) und mit 30 ml IEC-Puffer A (G150-Puffer) äquilibriert. Die DFPase wurde durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 – 35% IEC-Puffer B in einem Volumen von 75 ml eluiert und dabei durch UV (280 nm)-Detektion verfolgt. Die das Eluat enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit Hilfe von Vivaspin-Konzentratoren auf G150-Puffer umgestellt und bis zur gewünschten Konzentration aufkonzentriert (3000 g, 4 °C). Bis zur weiteren Verwendung wurde die DFPase-Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

2.4.3.1 Isolierung der isotopenmarkierten DFPase

Während die Isolierung der ^{15}N -angereicherten DFPase der Isolierung der nichtmarkierten DFPase entsprach, wurde die Isolierung der $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ bzw. $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -angereicherten DFPase etwas modifiziert.

Da die Proteinmenge bei den doppel- bzw. dreifach-markierten Proben geringer als bei den nichtmarkierten bzw. einfach-markierten Proben war, wurde der Zellaufschluß und die Zentrifugation des Zelldebris zweimal durchgeführt. Nach dem Thrombin-Verdau wurde das ^2H -angereicherte Protein zur Vermeidung von Proteinverlusten nicht einer zweiten Metall-Chelat-Affinitätschromatographie unterzogen, sondern direkt durch eine Anionenaustauschchromatographie mittels einer Resource Q oder einer Q-Sepharose HP-Säule von dem Thrombin und der Oligohistidindomäne abgetrennt. Der Pufferwechsel am Ende der Isolierungsprozedur erfolgte bei den $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -angereicherten Proben mittels einer Druckfiltrationszelle (YM10 Membran).

Für die NMR-Proben wurde das angereicherte Protein auf NMR-Puffer (10 mM Bis-Tris-Propan, 5 mM CaCl_2 , pH 6,5) gebracht und auf eine Proteinkonzentration von 1mM für die $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - bzw. 2mM für die ^{15}N - bzw. $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -angereicherten Proben eingestellt. Anschließend wurden die NMR-Proben mit 0,03% (w/v) Natriumazid, 0,5 mg/ml Pefabloc[®], 0,2 mM DSS und 7,5% (v/v) D_2O versetzt. 500 μl bzw. 300 μl der Proteinlösung wurden dann in 5 mm NMR-Röhrchen oder in Shigemi-Röhrchen überführt.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt und zur Detektion und Überprüfung der Homogenität von DFPase enthaltenden Proben eingesetzt. Bei den hier verwendeten Gelelektrophoresen handelt es sich um Minigele mit einer Dicke von 1 mm; sie wurden in einer Mini-Protean II-Gelelektrophoreseapparatur durchgeführt. Zur elektrophoretischen Trennung wurden je nach Bedarf 12%- oder 16,5%ige Polyacrylamidtrenngele und 7,5%ige Sammelgele verwendet. Diese setzen sich aus den in der folgenden Tabelle aufgeführten Komponenten zusammen:

	Trenngel		Sammelgel
	12%	16,5%	7,5%
H ₂ O _{milli}	1500 µl	-	1500 µl
SDS [1% (w/v)]	1000 µl	1000 µl	500 µl
1,5M Tris/HCl (pH 8,9)	2500 µl	2500 µl	-
0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	1000 µl
Acrylamid / Bisacrylamid	4000µl	5500 µl	1000 µl
Glycerin [50% (v/v)]	1000 µl	1000 µl	-
Temed	25 µl	25 µl	10 µl
APS [10% (w/v)]	40 µl	40 µl	25 µl

Vor dem Probenauftrag wurden die zu trennenden Proteinproben mit 5x SDS-Probenpuffer (250 mM Tris/HCl, 25 % (v/v) Glycerin, 12,4% (v/v) β -Mercaptoethanol, 7,5 % (w/v) SDS, 0,25 mg/ml Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Im Verlauf der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben für 15 Minuten bei einer Spannung von 100 V fokussiert; die weitere Trennung der Proteingemische erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 200 V für 45 Minuten.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele in Coomassie Blau-Lösung (0,25% (w/v) Coomassie Blue R 250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig) überführt, für 2 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt und 20 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Nach

vollständiger Färbung wurden die Polyacrylamidgele über Nacht in Entfärbelösung (40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig, 5% (v/v) Glycerin) inkubiert und anschließend auf Whatman-Papier aufgezogen und unter Vakuum bei 85 °C getrocknet.

2.4.5 Blau native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Bei der BN-PAGE bleibt die native Konformation der Proteine erhalten, wodurch kleine Strukturänderungen, Interaktionen mit anderen Proteinen oder Polymerisierungen der Proteine aufgrund von unspezifischer Bindung an das in den verwendeten Puffern enthaltene Coomassie Blau sichtbar gemacht werden können. Die elektrophoretische Trennung der Proteine ist hierbei von der Molekülgröße, -form und -ladung abhängig. Ein Polyacrylamidgradient wird zusätzlich verwendet, da das Gradientengel der Diffusion entgegenwirkt und somit eine schärfere Trennung der Proteinbanden erreicht werden kann. Die hier verwendete BN-PAGE erfolgte nach Schägger et al. (1994) und wurde zur Detektion möglicher Strukturänderungen oder Polymerisierungen der DFPase-Mutanten eingesetzt.

Für das Trenngel wurde ein linearer 4%- bis 16%iger Polyacrylamidgradient verwendet; während des Gelgießens wurde der hochkonzentrierten Lösung kontinuierlich niedrigkonzentrierte Lösung zugemischt. Die Trenn- und Sammelgele setzen sich aus den in der folgenden Tabelle aufgeführten Komponenten zusammen:

	Trenngel		Sammelgel
	4%	16%	4%
Gelpuffer nativ	1900 µl	1900 µl	1670 µl
Acrylamid / Bisacrylamid	800 µl	3160 µl	667 µl
H ₂ O _{milli}	3200 µl	-	2640 µl
Glycerin [50% (v/v)]	-	1000 µl	-
Temed	4 µl	4 µl	4 µl
APS [10% (w/v)]	20 µl	20 µl	20 µl

5 - 10 µg Proteinlösung wurden mit 2,5 µl 5x Probenpuffer (5% Coomassie Blue R 250 in 500 mM 6-Aminocapronat, 50% (w/w) Glycerin) versetzt und direkt aufgetragen. Die während der Gelelektrophorese angelegte Spannung betrug 100 V in den ersten 15 Minuten und 130 V für weitere 90 Minuten.

Zur Färbung wurden die Gele nach der Elektrophorese 30 Minuten in Coomassie Blau-Färbelösung und anschließend über Nacht in Entfärbelösung inkubiert und getrocknet (s. Abschn. 2.4.4).

2.4.6 Metallaustausch an der DFPase

Das niederaffine Calciumatom der DFPase (Ca-1), welches für die Katalyse essentiell ist (Scharff, 2000) wurde durch paramagnetische bivalente Kationen und Lanthaniden über Gleichgewichtsdialyse ausgetauscht. Das Ziel war einerseits, den Effekt des Metallaustausches auf die Aktivität des Enzyms zu untersuchen, andererseits wurden Lanthanide und das paramagnetische Metall Co^{2+} an der Position des Ca-1 Atoms für NMR-Messungen eingebaut. Der Einbau von paramagnetischen Metallen führt zu einer bevorzugten Ausrichtung des Proteins im magnetischen Feld, weil sie eine Suszeptibilitätsanisotropie aufweisen. Metall-enthaltende Proteine mit eingebauten paramagnetischen Metallen zeigen dadurch ^1H - ^{15}N "residual dipolar couplings" (rdc), welche zur Strukturbestimmung verwendet werden können.

Sämtliche für den Metallaustausch verwendeten Gefäße wurden mit 2 mM EDTA über Nacht inkubiert und anschließend gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$ (Widerstand = 18,2 MΩ) gespült. Je nach Experiment wurden 1 – 100 mM des entsprechenden Metallsalzes in 10 mM Tris (pH 7,5 mit HCl eingestellt) gelöst. Falls notwendig, wurde der pH-Wert mit NaOH korrigiert. Die Proteinkonzentration der eingesetzten Proteinlösungen betrug 1 - 2 mg/ml. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch überführt und bei 4 °C gegen das 100fache Volumen des entsprechenden Puffers dialysiert. Die Dialysedauer betrug 3 – 12 Tage je nach Experiment, wobei nach jeweils 24 Stunden der Dialysepuffer ausgetauscht wurde und Proben für TXRF-Analyse sowie für Aktivitätsmessungen entnommen wurden. Nach Beendigung des Experiments wurden die Proteinlösungen für die Analytik mittels TXRF vorbereitet (s. Abschn. 2.6.2)

2.4.6.1 Metallaustausch an ^{15}N -markierter DFPase

Für die Durchführung von NMR-Experimenten zur Messung von "residual dipolar couplings" war der Metallaustausch an ^{15}N -markierter DFPase notwendig. Eine homogene ^{15}N -markierte DFPase-Lösung (s. Abschn. 2.4.3.1) wurde gegen das entsprechende Metall über einen Zeitraum von drei bis fünf Tagen dialysiert (s. Abschn. 2.4.6). Anschließend wurde die derivatisierte Probe in NMR-Puffer (10 mM Bis-Tris-Propan, mit Essigsäure auf pH 6,5 eingestellt) überführt und bis zur einer Endkonzentration von 1 mM aufkonzentriert.

2.4.7 Kristallisation der DFPase

Die Struktur der Wildtyp-DFPase wurde mittels Röntgenkristallographie bis zur einer Auflösung von 1,8 Å ermittelt (Scharff et al., 2001a, 2001b). Drei der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mutanten wurden erfolgreich kristallisiert und deren Struktur ermittelt.

Für die Kristallisationsansätze wurde die jeweilige Mutante, wie in den Abschn. 2.4.1 und 2.4.3 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt. Die homogene Proteinlösung wurde mit für jeden Ansatz neuen Vivaspin-Konzentratoren (MWCO: 10 kDa), welche zuvor mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$ (Widerstand: 18,2 MΩ) und mit G150-Puffer gespült worden waren, bis zu einer Endkonzentration von 2 mM eingengt.

Der Kristallisationsansatz erfolgte nach der "Hanging Drop"-Methode (McRee, 1993), wie in der folgenden Abbildung dargestellt:

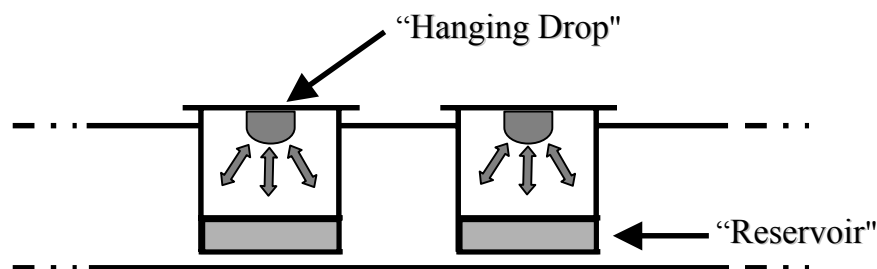


Abb. 2.1: Kristallisation nach der "Hanging Drop"-Methode

Zunächst wurde in die Reservoirs einer Linbro-Platte jeweils 1 ml der entsprechenden Pufferlösung vorgelegt. Anschließend wurden 2 μ l Proteinlösung und 2 μ l des jeweiligen Puffers auf einem silanisierten Deckglas durchmischt. Dieses Deckglas wurde dann vorsichtig umgedreht und über das mit Schliffett umgebene Reservoir plziert, sodass der Tropfen mit der Proteinlösung in einem luftdicht verschlossenen System über der Reservoirlösung (durch Adhäsionskräfte am Deckglas gehalten) zu hängen kommt. Wenn sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Lösungen eingestellt hat, kann das Protein kristallisieren. Die Linbro-Platten wurden anschließend bei 16 °C für zwei bis zehn Tage gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die Kristallbildung mit einem Lichtmikroskop kontrolliert.

Zur Züchtung von Kristallen der DFPase mit möglichen Enzyminhibitoren wurden zwei Vorgehensweisen verwendet. Bei der Kokristallisation der DFPase mit dem Liganden wurden die Lösungen mit dem Protein und Liganden vor dem Kristallisationsansatz miteinander gemischt und wie oben aufgeführt kristallisiert. Der hohe Wassergehalt in Proteinkristallen lässt aber auch die Möglichkeit zu, kleine Moleküle in die Kristalle diffundieren zu lassen. Bei diesen sogenannten "soaking"-Experimenten wurden Proteinkristalle in eine Pufferlösung des Liganden eingelegt; in diesem Fall sollte der Ligand in die Bindungstasche diffundieren und sich dort einlagern können, ohne dass sich der Proteinkristall dabei verändert.

2.5 Kinetische Messungen

2.5.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DFPase

Die DFPase katalysiert die Hydrolyse von 1 mol DFP zu 1 mol Diisopropylphosphat, 2 mol Protonen und 1 mol Fluoridionen, wobei nach Definition (Storkebaum et al., 1975) die Spaltung von 1 μ mol DFP pro Minute einer Enzymaktivität von 1 U entspricht (s. Abb. 2.2)

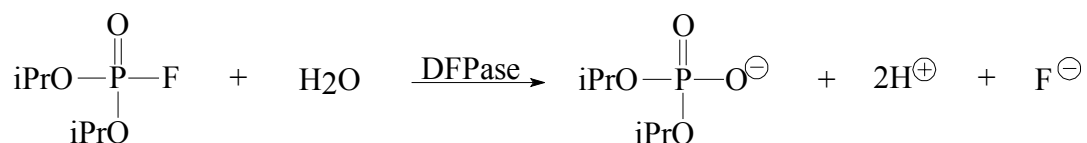


Abb. 2.2: Die von der DFPase katalysierte DFP-Hydrolysereaktion. Mit jedem hydrolysierten DFP-Molekül werden gleichzeitig bei pH 7,5 ein Fluoridion und zwei Protonen freigesetzt.

Die zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der DFPase verwendeten Methoden basieren auf Detektion der bei der Hydrolyse des DFP freiwerdenden Protonen (Hoskin & Long, 1972) oder Fluoridionen (Hoskin & Prusch, 1983). Da die von der DFPase katalysierte Reaktion durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann, wurden beide Methoden unter Substratsättigungsbedingungen durchgeführt.

2.5.2 Nachweis der Protonen über die pH-Stat-Methode

Die Bestimmung der bei der Hydrolyse freiwerdenden Protonen wurde durch Titration mit 10 mM NaOH in der Meßzelle der pH-Stat Apparatur VIT 90 bei einer konstanten Temperatur von 25 °C und unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Der Testansatz setzt sich aus ca. 2,6 ml einer wäßrigen 10 mM Natriumchloridlösung und 300 µl einer DFP-Lösung (1% (v/v) DFP in Ethanol, ca. 5 mM) zusammen. Der pH-Wert der Lösung wurde manuell auf 7,5 eingestellt und durch Zugabe der entsprechenden Enzymlösung die enzymatische Reaktion gestartet. Durch Titration der freigesetzten Protonen mit einer 10 mM NaOH Lösung über einen Zeitraum von 10 bis 15 Minuten konnte die Reaktion verfolgt werden.

Zur Berechnung der Enzymaktivität aus dem NaOH-Verbrauch mußte die Eigenhydrolyse des DFP in wäßriger Lösung berücksichtigt werden. Diese Wasserhydrolyse wurde täglich vor Durchführung der Enzymaktivitätstests mittels der pH-Stat Apparatur bestimmt. Die Bestimmung der Wasserhydrolyse erfolgte analog zum Aktivitätstest,

allerdings wurde der DFP-Umsatz ohne Zugabe von Enzymlösung über eine Zeit von 40 Minuten verfolgt. Nach Korrektur der Aktivitätsmessungen um den Wert der Wasserhydrolyse wurde die Enzymaktivität in U/ml erhalten.

2.5.3 Detektion der Fluoridionen

Die Detektion der bei der DFP-Hydrolyse freiwerdenden Fluoridionen erfolgte über eine kombinierte Fluoridelektrode. Die Meßdaten für die Wasserhydrolyse (s. Abschn. 2.4.6.3) des DFP und die Aktivitätstests wurden mit dem pH/Ion Meter pHM 240 aufgenommen.

Vor der Durchführung der Aktivitätsmessungen wurden zur Eichung der Fluoridelektrode zwei Standardlösungen mit Fluoridkonzentrationen von 10^{-5} M und 5×10^{-3} M Fluorid eingesetzt. Anschließend wurde die Wasserhydrolyse des DFP bestimmt; hierzu wurden im Reaktionsgefäß 4,3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$, 0,2 ml Puffer $((\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3, 0,5 \text{ M}, \text{pH } 7,5)$ und 0,5 ml 1%ige ethanolische DFP-Lösung gemischt und die Fluoridfreisetzung über einen Zeitraum von 15 min verfolgt. Bei den Aktivitätstests wurde einer analogen Lösung die entsprechende Menge Enzym hinzugefügt. Nach Berücksichtigung der Wasserhydrolyse konnte aus der Steigung der erhaltenen Gerade die Enzymaktivität in U/ml berechnet werden.

2.5.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Aktivität der DFPase ist als der Quotient der gemessenen Aktivität (U/ml) und der Enzymkonzentration der Probe (mg/ml) definiert. Die spezifische Aktivität der Wildtyp-DFPase beträgt 200 U/mg.

Zum Vergleich der Reinheit unterschiedlicher DFPase-Proben und zum Vergleich der Aktivität von Wildtyp-DFPase mit der Aktivität von DFPase-Mutanten wurde die spezifische Aktivität der jeweiligen Enzymprobe bestimmt. Dies geschah über

Bestimmung der Proteinprobenkonzentration durch wiederholte Absorptionsmessungen bei 280 nm mit einem Cary 3 Spektralphotometer und Bestimmung der Probenaktivität durch wiederholte Messungen mit der pH-Stat- und der Fluoridmethode.

2.5.5 Kinetikmessungen an der DFPase

Zur Charakterisierung der DFPase-Mutanten wurden mögliche Veränderungen der kinetischen Parameter K_M und V_{max} im Vergleich zum nativen Enzym untersucht. Die Bestimmung der kinetischen Eigenschaften der Wildtyp-DFPase wurde ursprünglich von Schulz und Mitarbeitern (Schulz et al., 1987) mittels der pH-Stat Apparatur durchgeführt; folglich sind die in dieser Arbeit durchgeführten Kinetikmessungen analog erfolgt.

2.5.5.1 Theoretische Grundlagen

Die Kinetikmessungen der DFPase wurden unter der Annahme durchgeführt, dass die durch die DFPase katalysierte Reaktion mittels der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann. Die Gleichung, welche die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer einfachen enzymkatalysierten Reaktion von der Konzentration des eingesetzten Substrats wiedergibt (Gl. 2.1), wurde in dieser Form von G.E. Briggs und J. B. S. Haldane (Briggs & Haldane, 1925) entwickelt und ist eine Weiterentwicklung der bereits zuvor von L. Michaelis und M. L. Menten (Michaelis & Menten, 1913) aufgestellten Beziehung:

Gl. 2.1:
$$V_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_M + [S]}$$

mit:

- V_0 = Anfangsgeschwindigkeit
- V_{max} = maximale Geschwindigkeit
- $[S]$ = in der Reaktion eingesetzte Substratkonzentration
- K_M = Michaelis-Menten-Konstante

Zur Auswertung der kinetischen Messungen wurden die linearisierten Auftragungsweisen nach Lineweaver-Burk (Gl. 2.2) und Eadie-Hofstee (Gl. 2.3) herangezogen:

$$\text{Gl. 2.2:} \quad \frac{1}{V_0} = \frac{[S] + K_M}{V_{\max} * [S]} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_0 * [S]}$$

$$\text{Gl 2.3:} \quad V_0 = V_{\max} - \frac{K_M + V_0}{[S]} \quad \text{oder} \quad \frac{V_0}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_M} - \frac{V_0}{K_M}$$

Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{\max} erfordert die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit V_0 der Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$. Die Anfangsgeschwindigkeit V_0 kann unter der Annahme, dass der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes eine Reaktion erster Ordnung ist, mittels der "first order plots" bestimmt werden. Bei den "first-order-plots" wird der Logarithmus der Substratkonzentration zur Zeit t ($[S_t] = [S] - P_t$) gegen die Zeit aufgetragen und die Zeit-Umsatz-Kurve somit linearisiert. Für die Anfangsgeschwindigkeit V_0 gilt dann:

$$\text{Gl. 2.4:} \quad V_0 = 2,303 * \tan \alpha * [S]$$

Die Substratkonzentration $[S_t]$ kann aus der Differenz der insgesamt verbrauchten Natronlauge (sog. Endwert, s. Abschn. 2.4.8.2) und der zum Zeitpunkt t verbrauchten 10 mM NaOH bestimmt werden.

2.5.5.2 Substratkonzentrationsbestimmung

Wegen der Autohydrolyse der DFP-Lösung wurde vor jeder Meßreihe die exakte Substratkonzentration der DFP-Stammlösung mit Hilfe der pH-Stat Apparatur bestimmt. Hierzu wurden ca. 2,9 ml einer 10 mM NaCl-Lösung mit 20 µl der 1%igen ethanolischen DFP-Stammlösung versetzt und der pH-Wert der Lösung manuell auf 7,5 eingestellt. Das Volumen der eingesetzten NaCl-Lösung wurde dabei so variiert, dass das Gesamtvolumen

des Ansatzes 3 ml betrug. Die Enzymreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 5×10^{-11} mol DFPase gestartet und der NaOH Verbrauch bis zum nahezu vollständigen Ende der Reaktion (nach ca. zwei Stunden) verfolgt ("Endwert"). Aus dem Volumen der im Test eingesetzten DFP-Lösung und dem NaOH Verbrauch konnte dann die genaue Konzentration der DFP-Stammlösung berechnet werden.

2.5.5.3 Durchführung der kinetischen Messungen

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} wurde die Anfangsgeschwindigkeit V_0 bei acht verschiedenen Substratkonzentrationen S_0 (0,1 – 5 mM) ermittelt. Die Messungen wurden unter Stickstoffatmosphäre und mit Hilfe eines an der Titrationsapparatur angeschlossenen Wasserbades bei konstanter Temperatur (25 °C) durchgeführt. Bei allen Messungen wurden $3,43 \times 10^{-12}$ mol Enzym pro Test eingesetzt (0,024 U; $1,14 \times 10^{-9}$ M).

Bei allen Messungen wurde das Volumen der vorzulegenden 10 mM NaCl-Lösung so variiert, dass nach der Zugabe des der jeweiligen Substratkonzentration entsprechenden Volumens der ethanolischen DFP-Stammlösung das Gesamtvolumen des Ansatzes 3 ml betrug. Anschließend wurde der pH-Wert manuell auf 7,5 eingestellt und die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Ausgewertet wurden nur die Werte, die im Zeitraum von 5 bis 10 Minuten aufgenommen worden. Diese Werte wurden um die der Wasserhydrolyse entsprechenden Substratkonzentration korrigiert und zur Bestimmung von V_0 (s. Abschn. 2.4.8.1) von dem der jeweiligen Substratkonzentration entsprechenden Endwert (s. Abschn. 2.4.8.2) der Reaktion subtrahiert.

2.6 Spektroskopische Methoden

2.6.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Da die Wildtyp-DFPase sechs Tryptophan- und acht Tyrosinreste enthält, wurden die Absorptionsspektren der Proteinproben im Wellenbereich von 240 – 320 nm in G150-Puffer bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der reinen DFPase-Proben erfolgte über das Lambert-Beer'sche Gesetz durch Messung der Extinktion bei 280 nm mit einem Cary 3 Spektralphotometer und Verwendung des mittleren molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} (ϵ_{280} für die Wildtyp-DFPase = 40607 l/mol*cm) (Hartleib, 2000). Bei heterogenen Proteinproben wurde die Konzentration bei 205 nm über den Standardextinktionskoeffizienten ϵ_{205} (ϵ_{205} = 31 ml/mg*cm) bestimmt.

2.6.2 Totalreflektions-Röntgen-Fluoreszenzspektrometrie (TXRF)

Die TXRF wurde zur Bestimmung der Anzahl von Calciumatomen in den hergestellten DFPase-Mutanten sowie der Anzahl von Metallionen in den Proteinproben nach den Metallaustauschexperimenten herangezogen.

Diese Analysemethode erlaubt Messungen im mikromolaren Proteinkonzentrationsbereich zur Detektion von Metallionen im pg- bis sub-pg-Bereich und wird neben der Spurenanalytik für Oberflächenuntersuchungen eingesetzt (Zickermann et al., 1997). TXRF basiert auf dem Prinzip der Entstehung von monochromatischen Röntgenwellen in der Ebene einer polierten Reflektionsfläche, auf der sich eine Mikrogrammenge des zu untersuchenden Stoffes befindet. Der Einfallswinkel der primären monochromatischen Quanten auf die Reflektionsfläche ist so klein (ca. 0,1 °), dass diese totalreflektiert werden.

Die Vorbereitung der TXRF-Proben erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit H₂O_{milli} (Widerstand: 18,2 MΩ) in Vivaspin-Konzentratoren. Die Proteinproben wurden zunächst in Metallionen-freien Puffer (2 mM Tris/Acetate, pH 7,5) umgepuffert und bis 20 µM

aufkonzentriert. Das bei der TXRF eingesetzte Probenvolumen betrug 100 μ l. Bei jeder Messung wurde als Blindwert der Metallgehalt des Puffers sowie des benutzten $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$ überprüft.

Die TXRF-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Martina Mertens und Frau Claudia Rittmeyer am Institut für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Prof. B. O. Kolbesen, der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

2.7 NMR-Experimente

Alle in dieser Arbeit erwähnten NMR-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Frank Löhr an Spektrometern des Typs DMX600 und DRX800 bei einer Temperatur von 28 °C durchgeführt und ausgewertet. Eindimensionale Protonenspektren und zweidimensionale $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-Spektren (Pervushin et al., 1997) wurden zum Vergleich der DFPase-Mutanten mit der Wildtyp-DFPase herangezogen. Für die Untersuchung möglicher Protein-Ligand-Wechselwirkungen wurden ^{31}P eindimensionale Experimente und zum Zuordnen der Signale auch zweidimensionale HMBC-Experimente (Bax, 1994) durchgeführt. Mit den derivatisierten DFPase-Proben wurden $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY sowie gekoppelte HSQC Experimente (Madhu et al., 2001) aufgenommen.

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -und $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte DFPase-Proben wurden zur Korrelation von aromatischen $^1\text{H}^{\delta 2}/^{13}\text{C}^{\delta 2}$ oder $^1\text{H}^{\epsilon 1}/^{15}\text{N}^{\epsilon 1}$ Resonanzen mit aliphatischen $^{13}\text{C}^{\beta}$ Resonanzen in den Seitenketten von Histidin- und Tryptophanresten eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden $[\text{}^{13}\text{C}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-HCD(CG)CB, $[\text{}^{13}\text{C}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-HN(CDCG)CB, $[\text{}^{13}\text{C}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-HCD(CG)CB, $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-H(NCD)CG, $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-H(NCDCG)CB und $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -TROSY-HN(CDCG)CB Experimente durchgeführt (Löhr et al., 2002).

2.8 Strukturbestimmung und Verfeinerung der DFPase-Kristalle

2.8.1 Präparation und Vermessung der Kristalle

Kristallisation und Vermessung der DFPase-Kristalle wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Günter Fritsch und Dr. Jürgen Köpke vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main durchgeführt.

Die Kristallpräparation erfolgte unter Tieftemperaturbedingungen. Der Kristall wurde dabei aus dem hängenden Tropfen mit einer Nylonschleife in Kryopuffer (der als Reservoir verwendete Puffer plus 20% Glycerin) überführt und anschließend sofort im Stickstoffstrom ($-153\text{ }^{\circ}\text{C}$) des Kryokühlsystems (Oxford Cryosystems, England) eingefroren. Das Schockgefrieren verhindert, dass die Wassermoleküle im Proteinkristall nicht auskristallisieren können und den Kristall zerstören bzw. sprengen. Nach der Montage des Kristalls auf dem Goniometer des Röntgendiffraktometers wurde er so justiert, dass er bei allen Aufnahmewinkeln im Röntgenstrahl zentriert blieb. Während der gesamten Messung wurde der Kristall gekühlt. Das hat bei langen Aufnahmezeiten den Vorteil, dass die Röntgenstrahlung den Kristall während der Aufnahme langsamer zerstört als bei Raumtemperatur.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen kristallographischen Datensätze wurden in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main, unter Anleitung von Dr. Günter Fritsch aufgenommen. Die Messungen erfolgten am DESY in Hamburg an den EMBL Beamlines BW7A und BW7B und in Lure bei Paris an der Beamline DW32. Für die Aufnahme der Datensätze der Mutanten D232S und H287A wurde Strahlung der Wellenlänge $0,8459\text{ \AA}$, für die Datensätze der Mutante N175D die Wellenlänge $0,8435\text{ \AA}$ verwendet. Die Strukturrechnungen und -verfeinerungen wurden im Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main mit freundlicher Unterstützung von Dr. Jürgen Köpke durchgeführt.

2.8.2 Aufnahme der Beugungsbilder

Der montierte Kristall wurde um die Achse des Goniometerkopfes gedreht und mit Röntgenstrahlen aus einer senkrecht zu dieser Achse verlaufenden Richtung bestrahlt.

Wegen der scharfen Interferenzbedingungen (Erfüllung der Bragg'schen Beziehung) muß für jeden zu messenden Reflex die entsprechende Netzebene durch Drehung des Kristalls in die "Reflektionsstellung" gebracht werden. Die Orientierung der Netzebenen im Kristallgitter wird mit den Miller'sche Indizes genannten *hkl*-Werten charakterisiert. Weil die Einheitszellen von Proteinen im Gegensatz zu den Einheitszellen von niedermolekularen Verbindungen relativ groß sind, bringt schon die Drehung um einen kleinen Winkel (üblicherweise $0,5^\circ$ bis 2°) eine große Anzahl von Netzebenen in Reflektionsstellung. Die Reflexe, die aus dieser Drehung resultieren, wurden mit einem Flächendetektor aufgenommen. Es wurden in dieser Weise mehrere einander anschließende Aufnahmen ("frames") gesammelt, bis alle unabhängigen Reflexe bezüglich der Symmetrieeigenschaften der Raumgruppe des Kristalls erfasst worden sind. Dabei durfte der Drehwinkel einer Aufnahme nicht zu groß sein, um zu verhindern, dass Reflexe auf der Aufnahme überlappen. Der durch den Kristall hindurchtretende Primärstrahl wird durch einen Primärstrahlfänger absorbiert, um die Detektionssysteme vor energiereicher Strahlung zu schützen.

2.8.3 Datenanalyse

Die aus den Messungen erhaltenen Rohdaten für jeden Reflex wurden mit Hilfe des Programms "DENZO" (Otwinowski & Minor, 1997) prozessiert und hieraus die Miller'schen Indices (*hkl*), die integrierte Intensität $I(hkl)$ und deren Standardabweichung $\sigma(I)$ berechnet. Anschließend erfolgte mit Hilfe von verschiedenen in dem Programmpaket "ccp4 Suite" (Collaborative Computational Project, 1994) enthaltenen Programmen die Datenreduktion, so dass die optimalen Sätze für die Miller'schen Indices (*hkl*), die Strukturamplituden und ihre Standardabweichung σ_F , welche als Wichtungsfaktor

verwendet wird, bestimmt werden konnten. Die gemessenen Intensitäten $I(hkl)$ sind proportional zum Quadrat der für die Strukturlösung benötigten Amplituden der Strukturfaktoren $|F(hkl)|$. Die Umrechnung berücksichtigt u. a. Korrekturen für die Hintergrundintensität und für Lorentz- und Polarisationsfaktoren.

Beim Beugungsvorgang wird die dreidimensionale periodische Elektronendichtefunktion durch eine Fourieranalyse in eine Überlagerung vieler Einzelwellen zerlegt. Das Beugungsbild ist also als Fouriertransformierte des periodischen Aufbaus eines Kristalls zu betrachten. Kennt man die Einzelwellen mit ihren Amplituden und Phasen, so kann man durch Fouriersynthese die Elektronendichte ρ und damit den Inhalt einer Elementarzelle der Kristallstruktur zurückrechnen.

Die Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ des Punktes x,y,z im Einheitszellenvolumen V wird in Elektronen pro \AA^3 ausgedrückt (Gl. 2.4):

Gl. 2.4:
$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \cos 2\pi (hx - ky - lz - \alpha_{hkl})$$

Die Gleichung für die Elektronendichte ρ am Punkt x,y,z beinhaltet die Strukturamplituden $|F(hkl)|$ und den relativen Phasenwinkel $\alpha(hkl)$ eines jeden Reflexes. Jede Reflexion wird als sogenannte Elektronendichtewelle mit dreidimensionaler Periodizität repräsentiert, die durch den Miller'schen Index dieser Welle definiert ist. Die dreidimensionale periodische Elektronendichtefunktion wird dann durch Summierung dieser Elektronendichtewellen erhalten.

2.8.4 Strukturverfeinerung

Durch die Lösung der DFPase Struktur (Scharff, 2000) wurde ein Strukturmodell erhalten, welches als Vorlage für die Strukturverfeinerung der DFPase-Mutanten verwendet wurde. Die Verfeinerungsrechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms "Refmac5" (Murshudov

et al., 1997). Nach Abschluß jeder Verfeinerungsrunde konnten verschiedene Typen von Differenzelektronendichtekarten mit dem Programm "fft" generiert, mit Hilfe eines Graphikprogramms wie dem "Xtalview" (Mc Ree, 1993) visualisiert und zum Vergleich mit dem Wildtypmodell herangezogen werden. Das Programm "Xtalview" visualisiert die aus der Verfeinerungsrechnung stammenden Koordinaten und Elektronendichtekarten. Verwendet man in der Berechnung der Elektronendichtekarte als Koeffizienten die Differenz zwischen F_o und F_c , so wird eine Differenzelektronendichtekarte dargestellt. Die Elektronendichte wird üblicherweise mit der Differenz zwischen $2F_o$ und F_c berechnet, um den Einfluss der beobachteten Strukturamplituden zu verringern. Mit Hilfe der Differenzelektronendichtekarte können Teile des Modells identifiziert werden, wo die Verfeinerungsrechnung eventuell keine vollständige oder keine korrekte Anpassung an die Elektronendichte liefern konnte. An dieser Stelle konnte mit dem Graphikprogramm manuell in das Modell eingegriffen werden.

Ein Maß für die Qualität der Anpassung des atomaren Modells an die beobachteten Röntgenbeugungsdaten ist der kristallographische R-Wert, der sich direkt aus der Zielfunktion mit der Methode der kleinsten Quadrate ableiten lässt (Gl. 2.5):

$$\text{Gl. 2.5} \quad R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{\vec{h}} w_{\vec{h}} \|F_o(\vec{h}) - k|F_c(\vec{h})\|}{\sum_{\vec{h}} |F_o(\vec{h})|}$$

mit	$w(hkl)$:	ein Wichtungsfaktor
	k:	ein Skalierungs-Faktor
	$ F(hkl) _o$	die beobachtete Strukturamplitude
	$ F(hkl) _c$	die berechnete Strukturamplitude

Der kristallographische R-Wert nimmt Werte zwischen 0 und 1 an und wird auch häufig in Prozent angegeben.

Neben dem kristallographischen R-Wert wird bei den Strukturrechnungen der freie R-Wert

berechnet und angegeben (Brünger, 1995). Ein kleiner Prozentsatz (<5%) der gemessenen Daten wird in einem Testdatensatz T vom Rest, dem Arbeitsdatensatz A, abgetrennt. Nur die Daten des Arbeitsdatensatzes nehmen an der Verfeinerung teil, während der Testdatensatz zur Gegenkontrolle herangezogen wird. Der freie R-Wert wird aus diesen Testdaten berechnet (Gl. 2.6):

$$\text{Gl. 2.6} \quad R_{\text{free}} = \frac{\sum_{\vec{h} \in T \wedge \vec{h} \in A} \omega_{\vec{h}} \|F_o(\vec{h}) - k F_c(\vec{h})\|}{\sum_{\vec{h} \in T \wedge \vec{h} \in A} F_o(\vec{h})}$$

In der Regel ist der freie R-Wert höher als der kristallographische R-Wert, da die Daten des Testdatensatzes nicht an der Verfeinerung teilgenommen haben.

3. Ergebnisse und Diskussion

Durch die von Scharff et al. gelöste DFPase-Struktur war es möglich, das aktive Zentrum des Enzyms zu lokalisieren und zu charakterisieren sowie ein Modell für den katalytischen Mechanismus aufzustellen (Scharff et al., 2001a) (s. Abschn. 3.4.1 & Abb. 1.4). Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus weitgehend zu bestätigen, zusätzliche an der katalytischen Reaktion und an der Substratbindung beteiligte Aminosäurereste zu bestimmen und zu charakterisieren, die Rolle der zwei Ca-Atome genauer zu definieren und das Enzym durch "Protein Engineering" so zu verändern, dass die Katalyseaktivität erhöht wird und somit das Enzym zur Dekontamination effizienter eingesetzt werden kann.

Trotz intensiver Suche nach einem Inhibitor für die DFPase konnte bis heute keine Substanz gefunden werden, welche ausreichend stark an das aktive Zentrum der DFPase bindet, so dass ein Enzym-Inhibitor-Komplex kristallisiert oder mittels NMR untersucht werden konnte (s. Abschn. 3.3). Experimente, bei denen essentielle Aminosäuren chemisch modifiziert wurden, haben gezeigt, dass die Modifikation von Cystein, Tyrosin, Lysin, Arginin, Aspartat und Glutamat keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität des Enzyms ausübte (Hartleib, 2000). Eine weitere Methode, auf oben aufgeführten Fragestellungen einzugehen und die Funktionalität der DFPase genauer zu untersuchen, war die Erzeugung einer Reihe von Mutationen in verschiedenen Positionen des Enzyms. Ist die Struktur eines Enzyms bekannt, so ist es möglich, seine katalytischen Eigenschaften durch Einführung von Punktmutationen im aktiven Zentrum zu verändern. Im Beispiel von Papain wurde die katalytische Eigenschaft des Enzyms von einer Cystein Protease zu einer Nitrilhydratase durch die Einführung einer einzigen Punktmutation verändert (Dufour et al., 1995).

Die Herstellung der Mutanten erfolgte mit Hilfe des "Site-Directed Mutagenesis" Kit (Stratagene) durch Amplifikation des gesamten Plasmids pKKHisND mit komplementären Oligonukleotiden, welche die gewünschten Punktmutationen enthielten (s. Abschn. 2.1.3). Nach dem anschließenden Verdau des Templat-Plasmids mit *DpnI* verblieb im

Reaktionsgemisch nur das angestrebte Plasmid (s. Abschn. 2.3.11). Die isolierten Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung sowohl des Haupt- als auch des Nebenstrangs charakterisiert (s. Abschn. 2.3.11). Die somit hergestellten pKKHisND Plasmide der Mutanten N120D, N175D, F173L, F173W, F173Y, F173V, F173A, F173S, S271G, H224N/S271A, M148A, R146S, Y144S, T195L, T195V, T195A, D232S, F314A, H287F, H287L, H287W, H287Y, H287A, H287Q, S271A/F173L, D229N/N120D, S271A/D232S, Q77F, Q77Y, Q77W, Q304F, Q304W, N237S, N272F, D121F wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert und, wenn nicht anders vermerkt, unter den gleichen Bedingungen wie die Wildtyp-DFPase exprimiert und isoliert (s. Abschn. 2.4.1, 2.4.3). Die Analyse aller isolierten Mutanten mittels SDS-PAGE zeigte, dass alle Mutanten homogen dargestellt werden konnten.

3.1 Charakterisierung der nativen Struktureigenschaften der DFPase-Mutanten mittels BN-PAGE

Die Einführung von Punktmutationen in einem Protein kann zur Änderung der Ladung und dadurch der Tertiärstruktur des Proteins führen. Außerdem sind Dimerisierungen der Proteinmoleküle möglich. Zur Untersuchung, ob möglicherweise die eingeführten Mutationen in den DFPase-Mutanten, wie auch bei anderen Proteinen (Kajander et al., 2002), Strukturveränderungen hervorgerufen haben, wurden diese unter nicht-denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie Blau G-250 im nativen Zustand sichtbar gemacht (s. Abschn. 2.4.5). Bei der "Blue Native (BN)-PAGE" wird die elektrophoretische Mobilität eines Proteins durch die negative Ladung des gebundenen Coomassie-Blau-Farbstoffes und die Größe des Proteins bestimmt. Dadurch, dass das Coomassie-Blau G-250 an die Proteinoberfläche bindet, bekommt das Protein eine negative Ladung, unabhängig von seiner ursprünglichen Nettoladung, ohne seine native Struktur zu verlieren. Die Auflösung der BN-PAGE ist viel höher als die der Gelfiltration oder der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation (Schägger et al., 1995; Neff et al., 1999).

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Auftrennung der Mutanten W224Y, W224H, H287D, E21Q, Y144S, H224N/S271A, D229N/N120D, F173L und F173A sind Doppelbanden zu erkennen (s. Abb. 3.1), was darauf hindeutet, dass diese Mutanten in zwei Konformationen vorliegen. Außerdem zeigt die Mutante R146S (s. Abb. 3.1, D, Spur 2) ein viel höheres Molekulargewicht als der Wildtyp, während bei ca. 35 kDa nur ein kleiner Anteil des Proteins zu sehen ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um Dimere, welche sich bei der verwendeten Konzentration ausbilden. Die zweite Bande bei der Mutante F173W (s. Abb. 3.1, F, Spur 4) könnte auch auf eine teilweise Dimerisierung des Proteins hindeuten. Um dies zu überprüfen, wurde diese Mutante einer Gelfiltration unterzogen; wie Abb. 3.2 zeigt, enthält die F173W-Probe hierbei fast ausschließlich Monomere. Daraus lässt sich folgern,

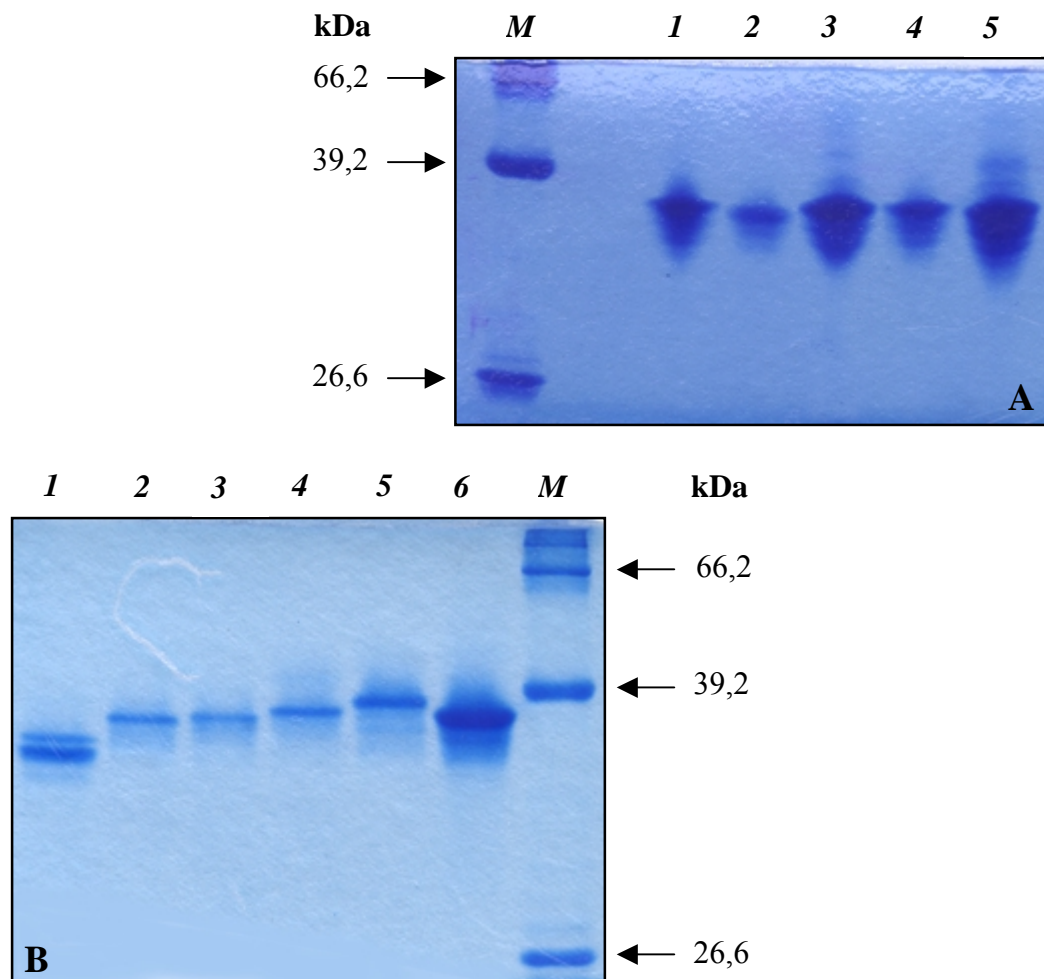


Abb. 3.1: Siehe Legende auf S. 48.

Ergebnisse und Diskussion

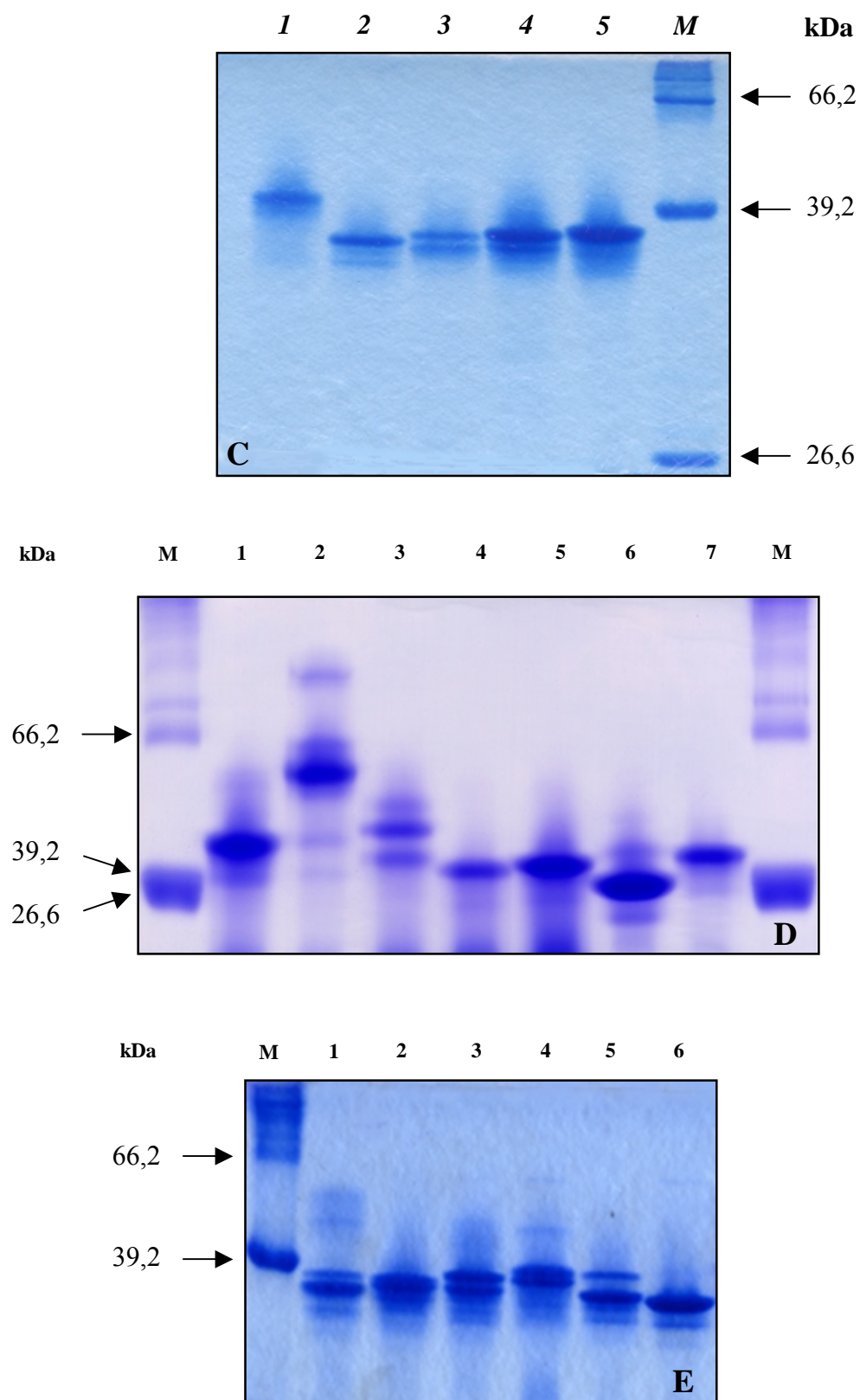


Abb. 3.1: Siehe Legende auf S. 48.

Ergebnisse und Diskussion

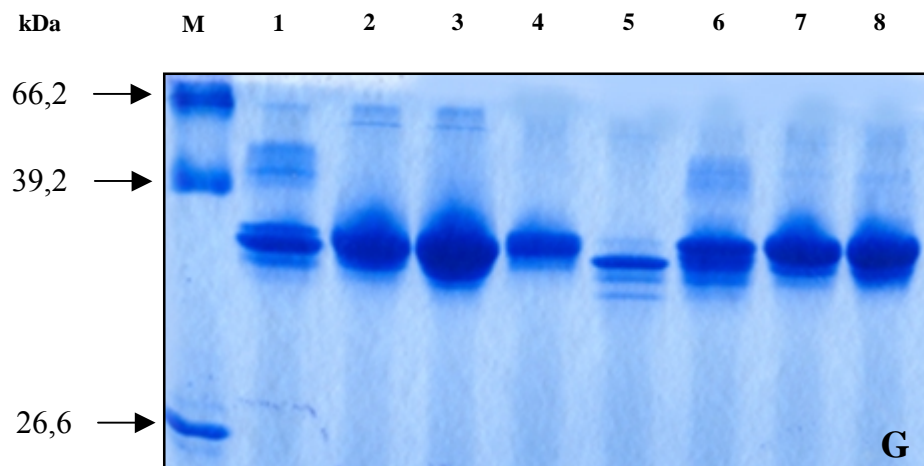
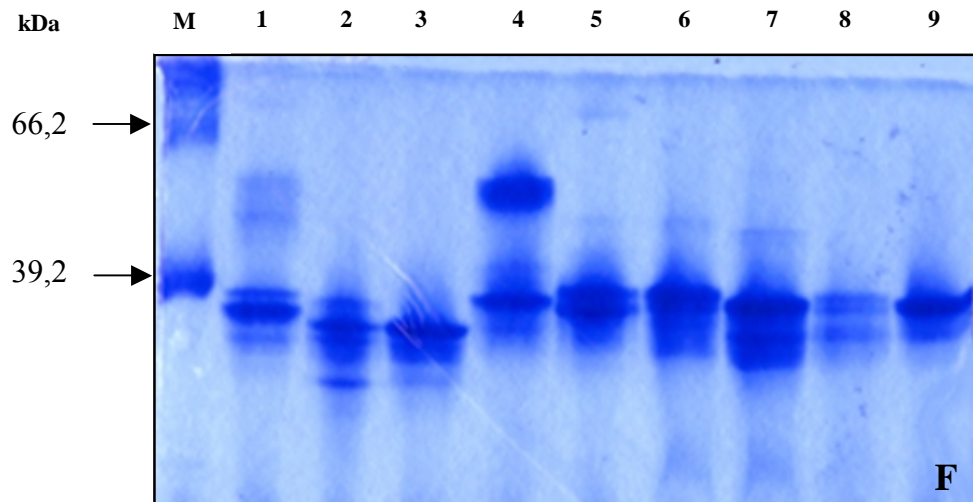


Abb. 3.1: BN-PAGE der DFPase-Mutanten. Aufgetragen wurden 10 μ g einer homogenen Proteinlösung der jeweiligen Mutante. Die Molekulargewichte der Markerproteine (M) sind am Rand angegeben. **A:** 1: Wildtyp; 2: H274N; 3: H181N; 4: H224N; 5: H287N. **B:** 1: H287D; 2: W224L; 3: W224F; 4: S271A; 5: D229N; 6: Wildtyp. **C:** 1: E37Q; 2: E21Q; 3: W224H; 4: W224Y; 5: Wildtyp. **D:** 1: M148A; 2: R146S; 3: Y144S; 4: T195V; 5: T195A; 6: D232S; 7: F314A. **E:** 1: Wildtyp; 2: S271G; 3: H224N/S271A; 4: S271A/F173L; 5: D229N/N120D; 6: S271A/D232S. **F:** 1: Wildtyp; 2: N120D; 3: N175D; 4: F173W; 5: F173L; 6: F173V; 7: F173S; 8: F173A; 9: F173Y. **G:** 1: T195V; 2: T195A; 3: T195L; 4: D232S; 5: F314A; 6: Q304F; 7: N237S.

dass es sich bei der zweiten Bande in der BN-PAGE, wie im Fall der R146S-Mutante, um Dimere handelt, welche anscheinend bei höherer Proteinkonzentration gebildet werden können.

Ergebnisse und Diskussion

Wie mit Hilfe der BN-PAGE gezeigt werden konnte, tritt bei keiner der anderen untersuchten DFPase-Mutanten eine Di- bzw. Oligomerisierung auf. Im Fall der F314A-Mutante wäre eine solche Oligomerisierung zu erwarten gewesen, da im Proteinkristall die Phe314-Seitenkette eines DFPase-Moleküls in die Bindungstasche des benachbarten Proteinmoleküls hineinragt, und zwar zwischen den aromatischen Ringen von Trp244 und Phe173 (Scharff et al., 2001a).

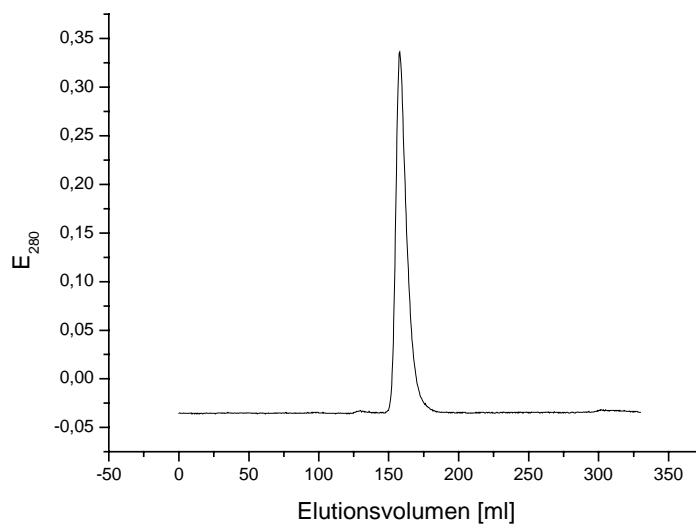


Abb. 3.2: Gelfiltration einer 12 mg F173W enthaltenden Proteinprobe mit einer Superdex 75-Säule. Die Flußrate betrug 1 ml/min.

3.2 Untersuchung der Substratbindung und des katalytischen Mechanismus der DFPase durch zielgerichtete Mutagenese

Die spezifischen Aktivitäten aller DFPase-Mutanten wurden mittels pH-Stat Apparatur und ionenspezifischer Fluoridelektrode bestimmt (s. Abschn. 2.5.1-2.5.4). Hierfür wurden alle Mutanten fünfmal exprimiert und aufgereinigt und die Aktivitäten durch jeweils

Ergebnisse und Diskussion

Mutante	pH-Stat	Fluorid	Mittelwert
	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]
WT	208 ± 13	180 ± 14	194
N120D	9 ± 1,5	5 ± 1,2	7
N175D	4 ± 1	3 ± 1,5	4
F173L	160 ± 12	126 ± 13	143
F173W	164 ± 11	151 ± 14	158
F173Y	125 ± 8	58 ± 8	92
F173V	119 ± 10	92 ± 10	105
F173A	34 ± 5	28 ± 6	31
F173S	83 ± 7	43 ± 6	63
S271G	22 ± 4	15 ± 3	19
H224N/S271A	222 ± 15	185 ± 13	204
M148A	148 ± 10	137 ± 12	143
R146S	100 ± 9	112 ± 9	106
Y144S	224 ± 17	193 ± 18	209
T195L	186 ± 13	160 ± 12	173
T195V	209 ± 16	166 ± 14	188
T195A	82 ± 7	65 ± 6	78
D232S	213 ± 13	185 ± 11	200
F314A	203 ± 14	195 ± 16	199
H287F	131 ± 10	117 ± 9	124
H287L	149 ± 10	159 ± 12	154
H287W	150 ± 12	107 ± 11	129
H287Y	91,3 ± 8	77,2 ± 9	84
H287A	17,4 ± 3	21 ± 4	19
H287Q	141 ± 11	39 ± 6	90
S271A/F173L	213 ± 18	156 ± 13	185
D229N/N120D	0	0	0

Ergebnisse und Diskussion

Mutante	pH-Stat	Fluorid	Mittelwert
S271A/D232S	183 ± 15	134 ± 12	158
Q77F	0	0	0
Q77Y	182 ± 14	165 ± 17	174
Q77W	205 ± 18	180 ± 17	193
Q304F	108 ± 9	86 ± 7	97
Q304W	205 ± 18	170 ± 13	188
N237S	187 ± 17	162 ± 15	187
N272F	0	0	0
D121F	0	0	0

Tab. 3.1: Gesamtübersicht der in dieser Arbeit erzeugten DFPase-Mutanten und deren spezifische Aktivitäten. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (in U/mg Protein) wurde die Aktivität der Proteinproben mittels pH-Stat- bzw. Fluoridmessungen bestimmt und die Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie bei 280 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280} = 40607$ l/mol*cm ermittelt. Alle angegebenen Werte wurden 10-15mal an Proteinproben aus mindestens fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt. In der rechten Spalte sind die aus den pH-Stat- und Fluoridmessungen errechneten Mittelwerte dargestellt.

mindestens zehn unterschiedliche pH-Stat- und Fluoridmessungen bestimmt. Die Analyse der spezifischen Aktivitäten aller DFPase-Mutanten und des Wildtyps (s. Tab. 3.1) zeigte, dass die mittels pH-Stat Messungen ermittelten Werte für die spezifische Aktivität mit Ausnahmen der Mutanten R146S, H287L, H287A, F173Y, F173S und H287Q um ca. 20% höher sind als die mittels Fluoridmessungen bestimmten Werte. Diese Unterschiede beruhen wahrscheinlich darauf, dass bei den Fluoridmessungen andere Reaktionsbedingungen (0,5 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 7,5) vorliegen als bei den pH-Stat Messungen (s. auch Abschn. 3.2.4.1 und 3.2.2). Die Konzentrationen der jeweiligen Proteinproben wurden UV-spektroskopisch bei 280 nm (Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280} = 40607$ mol/l*cm) gemessen.

Zur weiteren Charakterisierung der DFPase-Mutanten wurde der Calciumgehalt der jeweiligen Mutante mittels TXRF bestimmt (s. Abschn. 2.6.2). Die TXRF-Messungen

wurden für jede Mutante mindestens dreimal wiederholt und bei Mutanten, bei denen der Calciumgehalt von dem des Wildtyps deutlich abwich, wurden die TXRF-Messungen jeweils fünfmal wiederholt.

Zur Ermittlung weiterer Informationen über strukturelle Veränderungen, insbesondere im aktiven Zentrum des Enzyms, wurden einige der von den kinetischen Parametern her besonders interessanten Mutanten kristallisiert und deren Struktur gelöst und verfeinert (s. Abschn. 2.8.1-2.8.4). Außerdem wurden von Mutanten, welche einen totalen Aktivitätsverlust aufwiesen, mittels NMR-Spektroskopie eindimensionale Protonenspektren zum Vergleich mit dem Wildtyp aufgenommen. Inaktive Mutanten, von welchen aus einem Liter Bakterienkultur genügend homogenes Protein exprimiert und aufgereinigt werden konnte, wurden zusätzlich ^{15}N -markiert und ebenfalls NMR-spektroskopisch analysiert (s. Abschn. 2.7).

3.2.1 Mutationen in der Ca-1-Bindungsstelle der DFPase

Die DFPase besitzt ein nieder- (Ca-1) und ein hochaffines (Ca-2) Calciumion. Das Ca-1 ist für die katalytische Aktivität des Enzyms notwendig, weil es für die Bindung und Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum über elektrostatische Wechselwirkungen verantwortlich ist. Der Verlust des Ca-1 führt zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität der DFPase (Scharff et al., 2001a). Das Ca-1 hat einen B-Faktor von $7,7 \text{ \AA}^2$, befindet sich an dem einen Ende des zentralen Tunnels der DFPase und wird von den Resten Glu21, Asn120, Asn175 und Asp229 sowie den drei Wassermolekülen Wat44, Wat45 und Wat175 koordiniert (s. Abb. 3.3). Die mit dem Ca-1 koordinierten Sauerstoffatome der Aminosäureseitenketten bilden eine quadratische Ebene und das Ca-1 befindet sich geringfügig außerhalb dieser Ebene. Die drei Wassermoleküle bilden eine weitere Ebene in Form eines Dreiecks, das senkrecht zu der von den Aminosäureseitenketten gebildeten Ebene angeordnet ist. Obwohl die Anzahl der Liganden eigentlich für eine pentagonale Bipyramide spricht, existiert diese Anordnung beim Ca-1 nicht (Scharff et al., 2001a).

Ergebnisse und Diskussion

Die Mutanten E21Q und D229N weisen keine Enzymaktivität auf und besitzen jeweils nur ein Ca-Atom pro Proteinmolekül. Die Kristallstruktur der E21Q-Mutante und das CD-Spektrum der D229N-Mutante zeigten, dass die Einführung beider Mutationen keinen nennenswerten Effekt auf die Proteinstruktur hatte (Scharff et al., 2001a). Zur Untersuchung der Rolle von Ladungen in den Resten N120 und N175 wurden die Mutanten N120D und N175D erzeugt. Wie aus der Abb. 3.3 ersichtlich ist, wird das Ca-1 jeweils von dem Carbonylsauerstoffatom in den Seitenketten der Reste N120 und N175 koordiniert; daher war zu erwarten, dass die eingeführten Mutationen keinen Effekt auf die Koordination des Ca-1 und somit auf die Ca-1-Bindungsstelle haben sollten.

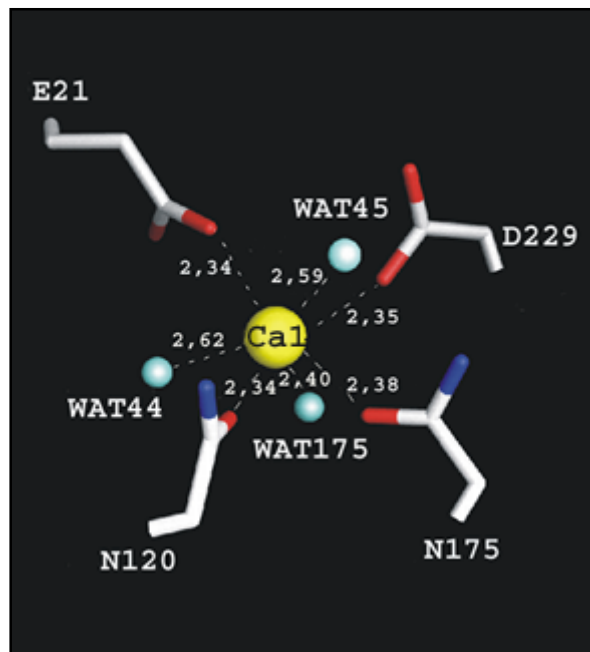


Abb. 3.3: Graphische Darstellung der Ca-1-Bindungsstelle der DFPase. Die Koordinationsabstände zum Ca-Ion sind in Å angegeben [entnommen aus Scharff et al., 2001a].

Die N175D-Mutante konnte auf dem normalen Expressionsweg erhalten werden (s. Abschn. 2.4.1). Die Expression der N120D-Mutante führte jedoch unter den Bedingungen, unter welchen die Wildtyp-DFPase exprimiert wurde (s. Abschn. 2.4.1), zur Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern ("Inclusion bodies"). Zur Isolierung der "Inclusion bodies" wurden 250 ml Kulturäquivalent in 6,25 ml Aufschlußpuffer

Ergebnisse und Diskussion

resuspendiert, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde eingefroren, die Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mittels des Ultraschallhomogenisators lysiert. Die lösliche Proteinfraction wurde verworfen und die "Inclusion bodies" durch Inkubation mit 6 M Harnstoff (Tris/HCl, pH 8,5) für zwei Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst. Zur Renaturierung des Enzyms wurde die Proteinlösung anschließend gegen Renaturierungspuffer (G150, pH 7,5, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) über 24 Stunden dialysiert. Die Renaturierung der löslichen Proteinfraction wurde im Anschluß an die Dialyse mittels SDS-PAGE und Aktivitätsmessungen überprüft (s. Abb. 3.4).

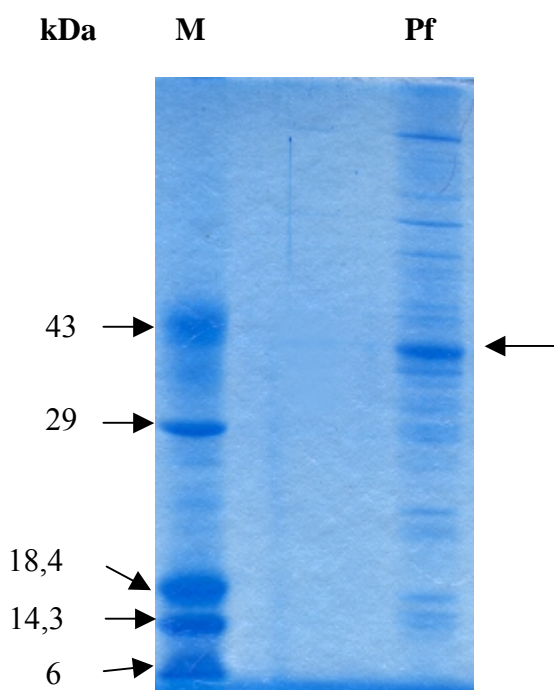


Abb. 3.4: SDS-PAGE zur Analyse der löslichen Proteinfraction nach der Renaturierung. Die Proteinprobe wurde unter reduzierenden Bedingungen auf das Gel aufgetragen. M: Protein-Molekulargewichtsstandard, Pf: lösliche Proteinfraction. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind am Rand angegeben.

Obwohl die renaturierte DFPase-Probe enzymatische Aktivität aufwies, war die durch die Renaturierungsexperimente erhaltene Proteinmenge sehr gering. Da die Löslichkeit rekombinanter Proteine durch Erniedrigung der Expressionstemperatur erhöht werden kann (Schein & Noteborn, 1988), wurde die N120D-Mutante zusätzlich bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ exprimiert. Ein Vergleich der unlöslichen Proteinfractionen der Expression bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o. Abb.) hat gezeigt, dass die höhere Ausbeute an löslichem, rekombinantem Protein bei

Ergebnisse und Diskussion

30°C auf eine verminderte Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten zurückzuführen war. Obwohl auch bei 30 °C noch ein geringer Anteil als Proteinaggregat exprimiert wurde, führte eine erneute Verringerung der Expressionstemperatur zu keiner weiteren Steigerung der Expressionsrate.

Die spezifische Aktivität der Mutanten N120D und N175D betrug nur 4% bzw. 2% der Aktivität des Wildtyps (Tab. 3.2). Außerdem enthielt die N120D-Mutante 2,8 Ca-Ionen pro Proteinmolekül, was darauf hindeutet, dass die Einführung einer dritten Asp-Seitenkette in die Ca-1-Bindungsstelle zur Bindung eines weiteren Ca-Ions führt. Da die N175D-Mutante hingegen nur 2 Ca-Ionen pro Proteinmolekül enthielt, scheint lediglich die dritte Asp-Seitenkette speziell an der Position 120 in der Bindung eines weiteren Ca-Ions zu resultieren.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	2,1 ± 0,2
N120D	7	4%	2,8 ± 0,2
N175D	4	2%	2,3 ± 0,2
D229N/N120D	0	0%	1,8 ± 0,1

Tab. 3.2: Spezifische Aktivität und Calciumgehalt der Mutanten der Ca-1-Bindungsstelle. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.5). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden.

Wie im Reaktionsmechanismus postuliert, entsteht im Übergangszustand möglicherweise eine Wasserstoffbrücke zwischen der Fluorid-Abgangsgruppe des DFP und der Aminogruppe von Asn120, wodurch die Abgangsgruppe stabilisiert wird (s. Abb. 1.4, Scharff et al., 2001a). Durch die Einführung des Aspartats in der Position 120 kann diese Wasserstoffbrücke nicht gebildet und somit der Übergangszustand der Hydrolysereaktion nicht stabilisiert werden. Der Aktivitätsverlust der N120D-Mutante könnte hierauf zurückzuführen sein.

Ergebnisse und Diskussion

Da es trotz Variation der Kristallisationsbedingungen nicht gelang, die Mutante N120D zu kristallisieren und uns somit keine Strukturinformationen über diese Mutante vorliegen, kann keine Aussage über die Position des dritten Ca-Ions gemacht werden. Die Bindung des zusätzlichen Ca-Ions in der Nähe der Ca-1-Bindungsstelle durch das Asp120 könnte auch den Aktivitätsverlust dieser Mutante erklären. Es ist nämlich aus den Metallaustauschexperimenten bekannt (s. Abschn. 3.5), dass die DFPase weitere niederaffine Metallbindungsstellen enthält, deren Besetzung möglicherweise zur Präzipitation aufgrund von Aggregation oder konformationellen Änderungen führt, welche ebenfalls in einem Aktivitätsverlust resultieren könnten.

Durch leichte Variation der von Scharff et al. (2001a) entwickelten Kristallisationsbedingungen konnten unter Verwendung von 12% PEG 10000 und 0,1M MES (pH 6,5) Kristalle der N175D-Mutante erhalten werden. Die N175D-Kristalle wuchsen in zwei bis drei Tagen und waren stabil, so dass sie über mehrere Stunden mit Synchrotronstrahlung vermessen werden konnten. Vor der Messung wurden die N175D-Kristalle für 20 Sekunden in Kryopuffer (Kristallisationspuffer plus 20% Glycerin) eingetaucht, so dass ihre Lebensdauer verlängert werden konnte (Scharff et al., 2001a).

Die Struktur der N175D-Mutante wurde bis zu einer Auflösung von 1,7 Å, einem RMSD-Wert für die Bindungslängen von 0,22 Å und für die Bindungswinkel von 1,86 Grad, einem R_{cryst} -Wert von 16,33% und einem R_{free} -Wert von 21,1% gelöst.

Da der Carbonylsauerstoff und nicht die Amidgruppe des Asn175 den Koordinationspartner des Ca-1 darstellt, ist es unwahrscheinlich, dass die Einführung der N175D-Mutation einen Effekt auf die Koordination des Ca-1 hat. Weiterhin sind, wie aus der Abbildung 3.6 und der Tabelle 3.3 ersichtlich wird, durch die eingeführte Mutation keine nennenswerten strukturellen Veränderungen an der Ca-1-Bindungsstelle hervorgerufen worden. Die Abstände zwischen dem Ca-1 und seinen Liganden haben sich bei der N175D-Mutante um maximal 0,2 Å im Vergleich zum Wildtyp-Enzym verändert.

Wie jedoch der Strukturvergleich der N175D-Mutante mit dem Wildtyp-Enzym in den Programmen Xtalview (McRee, 1993) und Insight (MSI, User Guide, 1997) zeigte, hat die

Ergebnisse und Diskussion

Einführung der Mutation einige Veränderungen in der Struktur des Enzyms hervorgerufen. Bei der N175D-Mutante hat sich das Wat46 dem Asp229 angenähert, wodurch eine Wasserstoffbrücke zum O δ 2 des D229-Restes gebildet wurde. Das O γ des Ser271 hat sich um ca. 120°, die Ringebene des Phe314 und die Glu37-Seitenkette haben sich um jeweils 90° gedreht. Das Ser271 soll keine essentielle Rolle an der katalytischen Aktivität der

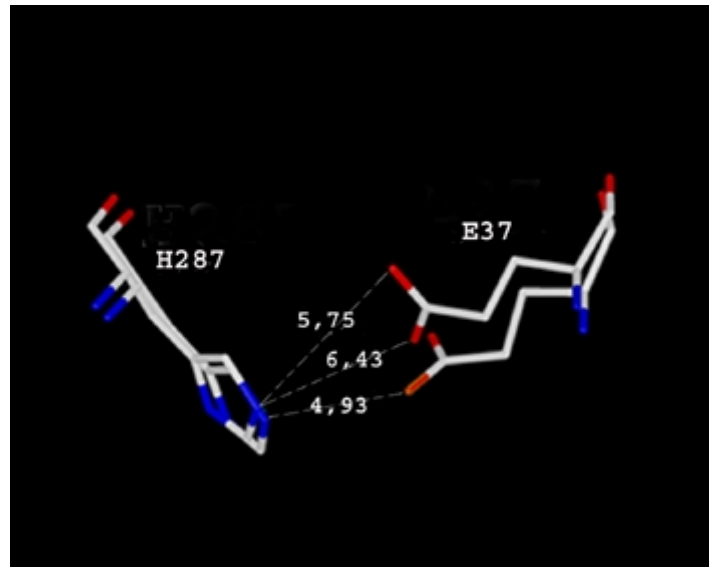


Abb. 3.5: Anordnung der Reste His287 und Glu37 beim Wildtyp-Enzym und bei der N175D-Mutante. Bei der Mutante hat sich das Glu37 um 90° gedreht, wodurch die Abstände der Carboxylatsauerstoffatome der Glu37-Seitenkette zum N ϵ 2 des His287 >5 Å sind. Die dargestellten Abstände sind in Å angegeben. Das Übereinanderlegen der Reste erfolgte mit dem Programm Insight (MSI, User Guide, 1997)

DFPase spielen, da die S271A-Mutante um 30% aktiver als das Wildtyp-Enzym ist und somit ausgeschlossen werden kann, dass die OH-Gruppe des Ser271 das Phosphoratom des DFP nukleophil angreift (Scharff et al., 2001a). Die Bewegung der OH-Gruppe des Ser271 in der N175D-Mutante sollte demzufolge den Aktivitätsverlust der Mutante nicht verursachen. Für den Rest Glu37 wird angenommen, dass es den im Übergangszustand der Hydrolysereaktion positiv geladenen His287-Imidazolring durch elektrostatische Wechselwirkungen über die negativ geladene Carboxylatgruppe stabilisiert. Dreht sich in der N175D-Mutante das Glu37 um 90°, so befindet sich die Carboxylatgruppe um mehr als

Ergebnisse und Diskussion

5 Å vom Ne2 des His287 entfernt, was möglicherweise zu einer Abschwächung des Stabilisierungseffektes bei der Katalysereaktion und somit zu einer Aktivitätsverringering der Mutante führen könnte (Abb. 3.5).

	Wildtyp	N175D
Oδ1 von Asn175 zum Ca-1	2,34 Å	-
Oδ1 von Asp175 zum Ca-1	-	2,30 Å
Oδ1 von Asn120 zum Ca-1	2,38 Å	2,43 Å
Oδ1 von Asp229 zum Ca-1	2,35 Å	2,39 Å
Oε2 von Glu21 zum Ca-1	2,34 Å	2,35 Å
WAT45 zum Ca-1	2,40 Å	2,53 Å
WAT175 zum Ca-1	2,40 Å	2,26 Å
WAT44 zum Ca-1	2,62 Å	2,42 Å

Tab. 3.3: Vergleich der Abstände der Ca-1-Liganden vom Ca-1 beim Wildtyp und bei der N175D-Mutante.

Der Aktivitätsverlust der N175D-Mutante dürfte somit auf der Einführung der weiteren negativen Ladung an der Ca-1-Bindungsstelle beruhen. Diese Mutation scheint die Elektrostatik in der Ca-1-Bindungsstelle bzw. im aktiven Zentrum des Enzyms zu verändern und dadurch die Substratbindung und -umsetzung zu beeinträchtigen.

Um den Einfluss des Ladungszustands der Ca-1-Bindungsstelle weiter zu untersuchen, wurde die Doppelmutante D229N/N120D erzeugt. Bei dieser Mutante wurde die Position von zwei Ca-1-Liganden ausgetauscht, bei gleichbleibender Nettoladung. Die D229N/N120D-Doppelmutante enthielt ebenfalls 2 Ca-Ionen pro Proteinmolekül, wies jedoch keine enzymatische Aktivität auf. Gleichzeitig deutete das eindimensionale Protonenspektrum der Doppelmutante, das mit dem Wildtyp-Spektrum vergleichbar ist, auf eine Erhaltung der Tertiärstruktur hin. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht nur

die Nettoladung an der Ca-1-Bindungsstelle für die katalytische Aktivität der DFPase wichtig ist, sondern auch die Position der jeweiligen Ladungen eine entscheidende Rolle spielt.

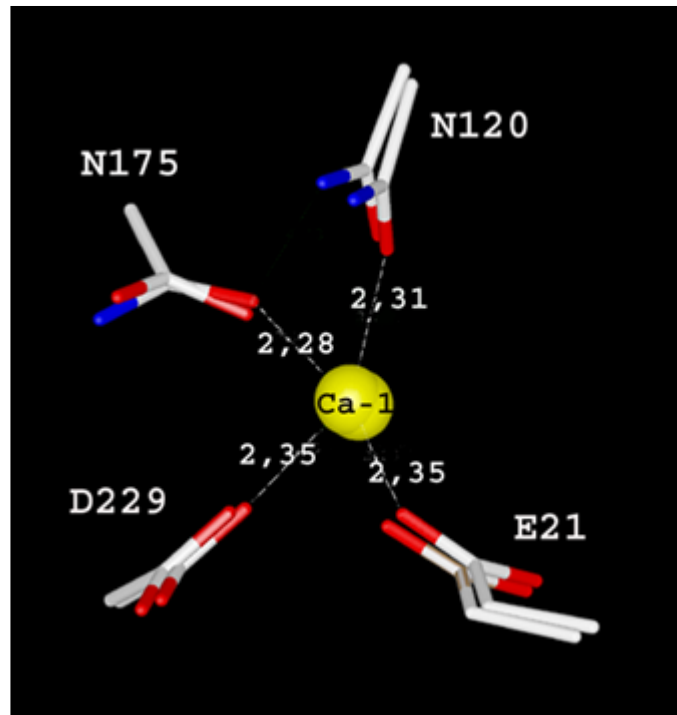


Abb. 3.6: Räumliche Anordnung der Proteinliganden in der Ca-1-Bindungsstelle beim Wildtyp und der N175D-Mutante. Die Abstände sind für den Wildtyp in Å angegeben. Das Übereinanderlegen der Reste erfolgte mit dem Programm Insight (MSI, User Guide, 1997).

Die Charakterisierung der N120D-Mutante deutet darauf hin, dass Asn120 sehr wahrscheinlich eine stabilisierende Funktion für die Fluorid-Abgangsgruppe besitzt. Weiterhin konnte mit Hilfe der Mutanten N120D, N175D und der Doppelmutante D229N/N120D gezeigt werden, dass die Präsenz des Ca-1 allein nicht die katalytische Funktion des Enzyms erfüllt, wie bisher angenommen, da alle drei Mutanten eine sehr geringe bzw. keine Enzymaktivität aufwiesen, obwohl sie mindestens zwei Ca-Atome pro Proteinmolekül enthielten. Vielmehr ist die Elektrostatik sowie die Position der einzelnen Ladungen an der Ca-1-Bindungsstelle für die Bindung und Orientierung des Substrats in dem aktiven Zentrum des Enzyms entscheidend.

3.2.2 Untersuchung der Rolle von His287

Kinetische, TXRF- und CD-Messungen der Mutante H287N zeigten, dass His287 als funktioneller Rest an der von der DFPase katalysierten DFP-Hydrolyse beteiligt ist. His287 übernimmt ein Proton von einem hydrolytischen Wassermolekül, so dass das dabei entstehende Hydroxylion das Phosphoratom des Substrats nukleophil angreifen kann (Hartleib, 2000).

Wie aus der Kristallstruktur der Wildtyp-DFPase ersichtlich wird, (s. Abschn. 3.2.3 und Abb. 1.4) ist das N δ 1-Atom der His287-Seitenkette über eine Wasserstoffbrücke mit dem He1-Atom des Trp244 und über eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen seinem He2 und dem Carbonylsauerstoff des Ala20 verbunden. Dementsprechend kann die His287-Seitenkette in dieser Position nicht als Protonenakzeptor fungieren. Eine Reorientierung der His287-Seitenkette ist daher notwendig, damit ein Proton vom hydrolytischen Wassermolekül auf den Imidazolring von His287 übertragen werden kann. Nimmt man an, daß nach der Protonenabstraktion eine Rotation dieses Restes erfolgt, so kann das doppelt protonierte His287 mit der Glu37-Seitenkette elektrostatisch wechselwirken, falls der letztere Rest ebenfalls reorientiert wird. Hierdurch würde eine der katalytischen Diade der Phospholipase A₂ entsprechende Anordnung entstehen (Scott et al., 1990; White et al., 1996). Wird zusätzlich das Ser271 reorientiert, wäre allerdings auch die Bildung einer den Serinproteasen ähnlichen katalytischen Triade möglich (Betzel et al., 1998; Warshel et al., 1989).

Es konnte aufgrund der Ergebnisse von Metallaustauschexperimenten ausgeschlossen werden, dass das Ca-1 das hydrolytische Wassermolekül aktiviert (Scharff et al., 2000). Die divalenten Metallderivate der DFPase besitzen eine hohe Enzymaktivität, was für Enzyme, die Calcium als essentiellen Cofaktor enthalten, recht ungewöhnlich ist. So werden die humane Serum-Paraoxonase 1 (PON1), die Phospholipase A₂, die Phosphodiesterase aus *Staphylococcus aureus* und die Phytasen aus *Bacillus sp.* DS11 und *Bacillus subtilis* bei der Substitution des essentiellen Calciumions gegen andere divalente Metallkationen fast vollständig inaktiviert (Kuo et al., 1997; Yu et al., 1998; Weber et al., 1991; Loll et al., 1995; Shimizu 1992; Kim et al., 1998) (Scharff et al., 2001a).

Ergebnisse und Diskussion

Da das His287 als Base fungieren soll, wurde angenommen, dass das N δ 1 der His287-Seitenkette ein Wassermolekül durch Protonenabstraktion aktiviert und die dadurch entstandene Hydroxylgruppe das Phosphoratom von DFP nukleophil angreift (Hartleib, 2000). Dementsprechend müßte ein Rest an der Position 287, welcher nicht als Protonenakzeptor fungieren und das Wassermolekül aktivieren kann, die katalytische Reaktion hemmen.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Hydrophobizität kcal/mol	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	0,64	2,1 \pm 0,2
H287F	124	64%	- 2,27	1,8 \pm 0,2
H287W	129	66%	- 2,13	2,4 \pm 0,4
H287L	154	79%	- 1,82	2,2 \pm 0,3
H287Y	84	43%	- 1,47	1,9 \pm 0,2
H287A	19	10%	- 0,39	2,0 \pm 0,1
H287Q	90	46%	1,30	2,0 \pm 0,3
H287N (Hartleib, 2000)	8	4%	1,91	2 \pm 0,3
H287D (Scharff, pers. Mitteilung)	2	1%	3,81	1,8 \pm 0,3

Tab. 3.4: Spezifische Aktivitäten, Calciumgehalt und Hydrophobizitätswerte der His287-Mutanten. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind die Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die dargestellten TXRF-Werte sind viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden. Die angegebenen Hydrophobizitätswerte sind aus Roseman et al. (1988) entnommen.

Zur genaueren Untersuchung des katalytischen Mechanismus und der Rolle des His287 an der Substratumsetzung wurden daher eine Reihe von His287-Mutanten erzeugt und charakterisiert. Hierbei wurden folgende Kriterien bei der Auswahl der Mutationen berücksichtigt: Die Fähigkeit des Restes 287 eine Wasserstoffbrücke mit dem Trp244

auszubilden, sollte für die Substratumsetzung von Bedeutung sein (Scharff, 2000). Außerdem ist, wie mit den früheren Ergebnissen gezeigt werden konnte, die Hydrophobizität der an der hydrolytischen Reaktion beteiligten Reste für die Substratumsetzung wichtig.

3.2.2.1 Substitution des His287 gegen aromatische Reste

Der Austausch des His287 gegen Trp und Phe führte zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität um 34% bzw. 36% im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität (s. Tab. 3.4). Tryptophan und Phenylalanin sind nahezu gleich hydrophob. In beiden Fällen ist die Ausbildung einer aromatischen Wasserstoffbrücke vom H ϵ 1 des Trp244 zum Phenylring des Phe287 bzw. zum Indolring des Trp287 vorstellbar, vorausgesetzt diese Ringsysteme stehen im rechten Winkel zum N-H-Vektor der Trp244-Seitenkette. Die Möglichkeit der Entstehung einer Wasserstoffbrücke zwischen O/N-H-Donor und der π -Elektronenwolke einer aromatischen Seitenkette wurde zum ersten Mal im Jahr 1936 beschrieben (Wulf et al., 1936), und ist bis heute ausführlich untersucht worden (Malone et al., 1997; Wlodawer et al., 1984; Perutz et al., 1986). Die Energie dieser aromatischen Wasserstoffbrücken ist allerdings geringer als bei den klassischen Wasserstoffbrücken. Der effizienteste π -Akzeptor in Proteinen ist die Indolgruppe des Tryptophans, einerseits aufgrund seiner großen aromatischen Oberfläche, andererseits aufgrund der konjugierten Natur der beiden kondensierten Ringe. Phenylalanin ist ein weniger effizienter Akzeptor, wahrscheinlich aufgrund der kleineren Ringoberfläche (Steiner & Koellner, 2001).

Allerdings liegen keine Strukturinformationen für die Mutanten Phe287 und Trp287 vor, so dass keine Aussage über die Orientierung der beiden Seitenketten gemacht werden kann. Es stellt sich hier die Frage, welche Rolle eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Rest 287 und Trp244 bei der Substratumsetzung spielt. Möglicherweise wird die Polarität des Trp244-His287-Systems durch das Bestehen dieser Wasserstoffbrücke herabgesetzt und dadurch die Bindung des Substrats gefördert. Die strukturellen und kinetischen Untersuchungen der Mutanten His244, Tyr244, Phe244 und Leu244 zeigten, daß His244 und Tyr244, welche eine Wasserstoffbrücke zum N δ 1 des His287 ausbilden, eine zur Wildtyp-DFPase vergleichbare Aktivität aufweisen (Scharff et al., 2001a). Im Falle der

Phe244- bzw. Trp244-Mutante ist eine Aktivierung des hydrolytischen Wassermoleküls durch die Seitenkette des Rests 287 jedoch nicht möglich.

Der Austausch des His287-Restes gegen Tyrosin führte zu einer deutlicheren Abnahme der spezifischen Aktivität des Enzyms, und zwar um 57% verglichen zum Wildtyp (Tab. 3.4). Tyrosin ist weniger hydrophob als Phenylalanin und Tryptophan und kann unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls nicht als Base fungieren. Vorausgesetzt der Phenylring des Tyrosins liegt senkrecht zum N-H-Vektor des Trp244, wäre, wie bei der H287W- und H287F-Mutante, eine aromatische Wasserstoffbrücke mit dem Trp244 vorstellbar, da der Phenylring vom Tyrosin ebenfalls π -Wasserstoffbrücken akzeptieren kann, allerdings mit geringerer Effizienz als die Tryptophan-Seitenkette (Steiner & Koellner, 2001).

Betrachtet man die Aktivitäten der Mutanten H287F, H287W und H287Y, so fällt auf, daß die Hydrophobizität an dieser Position von erheblicher Bedeutung für die enzymatische Reaktivität der DFPase ist. Die Tatsache, daß die Mutanten H287F, H287W und H287Y aktiv sind, jedoch mit geringerer Effizienz als das Wildtypenzym, erlaubt die Annahme, daß der Rest 287 zwar eine Rolle bei der Katalyse spielt, das nukleophil angreifende Wassermolekül aber u. U. "allein" die Hydrolysereaktion durchführen kann, ohne vorher aktiviert zu werden. His287 kann demnach als Protonenakzeptor förderlich sein, scheint aber nicht entscheidend zu sein.

3.2.2.2 Substitution des His287 gegen aliphatische Reste

Um die Rolle der Hydrophobizität unabhängig von der Aromatizität an der Position 287 zu überprüfen, wurde eine H287L-Mutante erzeugt, welche eine um nur 21% niedrigere spezifische Aktivität als der Wildtyp aufwies (s. Tab. 3.4). Das Leucin an der Position 287 kann weder eine Wasserstoffbrücke zum Trp244 noch eine Wasseraktivierung durchführen. Die nur geringfügig abgesenkte spezifische Aktivität der Leu287 im Vergleich zum Wildtyp deutet darauf hin, dass an der Position 287 nicht nur ein Aromat, sondern auch eine aliphatische hydrophobe Seitenkette für die Substratumsetzung geeignet ist, und dass die Substratbindung wahrscheinlich auch ohne das Vorhandensein einer

Wasserstoffbrücke zwischen dem 287-Rest und der Trp244-Seitenkette erfolgen kann. Außerdem war die H287L-Mutante 38% aktiver als die H287Y-Mutante (s. Tab. 3.4). Dies könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass Tyrosin weniger hydrophob als Leucin ist.

Um die Rolle der Größe der hydrophoben Seitenkette an der Position 287 zu untersuchen, wurde das His287 gegen Alanin ausgetauscht. Dieser Austausch führte zur massiven Erniedrigung der enzymatischen Aktivität der Mutante, welche nur 10% der Wildtyp-Aktivität betrug (s. Tab. 3.4). Alanin kann weder eine Wasserstoffbrücke zum Trp244 ausbilden, noch ist es in der Lage, als Base zu fungieren. Die besonders geringe Aktivität der H287A-Mutante deutet darauf hin, dass an der Position 287 ein aromatisches Ringsystem oder eine größere aliphatische, hydrophobe Seitenkette für die Substratbindung und –umsetzung förderlich ist.

3.2.2.3 Substitution des His287 gegen polare Reste

Der Austausch des His287 gegen Asparagin oder Aspartat führte zu einer fast vollständigen Inaktivierung des Enzyms (s. Tab. 3.4). Das O δ 1-Atom von Asparagin könnte die Position des N δ 1-Atoms des Imidazolrings von Histidin einnehmen, so dass die Wasserstoffbrückenbindung mit dem Trp244 erhalten bleibt. In erster Linie dürfte der Verlust der enzymatischen Aktivität dieser Mutanten auf die Ladung und Hydrophilie der Asparagin- und Aspartat-Seitenketten zurückzuführen sein, da ein hydrophober Rest an dieser Position auf die Katalysereaktion förderlich wirkt (s.o). Weiterhin könnte die geringe Aktivität sowohl der H287N- als auch der H287D-Mutante darauf beruhen, dass das Asparagin bzw. das Aspartat mit dem hydrolytischen Wassermolekül elektrostatisch wechselwirkt, welches dadurch nicht aktiviert werden und entsprechend das Phosphoratom des DFP nicht angreifen kann. Möglicherweise ist der nukleophile Angriff des hydrolytischen Wassermoleküls auf das Phosphoratom in stark hydrophober Umgebung begünstigt.

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen der Mutante H287Q passen allerdings zu keinem der bisher aufgeführten Schemata über die Rolle des Restes 287. Wichtig ist hier

Ergebnisse und Diskussion

anzumerken, dass, wie aus der Tabelle 3.1 ersichtlich, die spezifischen Aktivitäten der H287Q-Mutante sehr stark in Abhängigkeit von der zur Aktivitätsbestimmung verwendeten Methode schwankten und trotz mehrmaligen Wiederholungen der Messungen sich nicht genauer bestimmen ließen. Während die mittels pH-Stat-Messungen ermittelte spezifische Aktivität der H287Q-Mutante 73% der spezifischen Aktivität des Wildtyps betrug, entsprach die mittels Fluoridmessungen bestimmte spezifische Aktivität nur 20% der spezifischen Aktivität des Wildtyps. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die bei den Fluoridmessungen herrschende Ionenstärke, welche höher ist, als bei den pH-Stat-Messungen, zu einer weniger spezifischen Bindung des Substrats an das Enzym führt.

Berücksichtigt man den Mittelwert aus pH-Stat- und Fluoridmessungen, so würde die H287Q-Mutante eine ähnliche spezifische Aktivität wie die H287Y-Mutante aufweisen (s. Tab. 3.4), also um nur 54% inaktiver als der Wildtyp. Das Glutamin ist zwar hydrophober als das Asparagin (H287N), trotzdem aber hydrophil genug, dass die Substratbindung und –umsetzung auch bei dieser Mutante beeinträchtigt werden sollte. Zusätzlich besteht für die H287Q-Mutante die Möglichkeit, wie bei den H287N- und H287D-Mutanten, dass das Glutamin mit dem hydrolytischen Wasser elektrostatisch wechselwirkt und seine Aktivierung verhindert. Allerdings könnte das Gln287, aufgrund seiner um eine Methylengruppe längeren Seitenkette im Vergleich zum Asparagin, eventuell beide Wasserstoffbrücken, zum Trp244 He1- und zum Ala20-Sauerstoffatom, bilden. Solch eine Interaktion würde das gesamte Trp244-Gln287-Ala20-System gleichzeitig weniger polar machen und somit die Substratbindung unterstützen. Dies könnte die höhere Aktivität der H287Q-Mutante im Vergleich zur H287N-Mutante erklären. Berücksichtigt man allerdings die mittels der Fluoridmessungen bestimmte Aktivität der H287Q-Mutante, so wäre diese Mutante um nur 16% aktiver als die H287N-Mutante. In diesem Fall wäre die massive Erniedrigung der spezifischen Aktivität, wie im Fall der H287N-Mutante, auf die Hydrophilie des Glutamins und auf die vermutliche elektrostatische Wechselwirkung mit dem zu aktivierenden Wassermolekül zurückzuführen. Die um 16% höhere Aktivität der H287Q-Mutante gegenüber der H287N-Mutante wäre somit alleine dem etwas hydrophoberen Charakter der Glutaminseitenkette zuzuschreiben.

Ergebnisse und Diskussion

Die Erniedrigung der katalytischen Aktivität und die Beeinträchtigung der Substratbindung bei den Mutanten H287Y, H287A, H287Q, H287N und H287D kann nicht auf den Verlust des Ca-1 zurückgeführt werden, da alle diese His287-Mutanten zwei Ca-Ionen pro Proteinmolekül enthielten, wie die TXRF-Messungen ergaben (s. Tab. 3.4). Der Aktivitätsverlust der Mutanten könnte andererseits auch auf konformationelle Veränderungen des Proteins beruhen. Zur eingehenderen Untersuchung der niedrigen Aktivität dieser Mutanten wurde versucht, sie zu kristallisieren. Trotz umfangreicher Variationen der Standard-Kristallisationsbedingungen für die Wildtyp-DFPase (Scharff et al., 2001b) ist es nicht gelungen, die His287-Mutanten zu kristallisieren, mit Ausnahme der H287A-Mutante.

Die H287A-Mutante wurde in 13% PEG 4000 und 0,1M MES (pH 6,0) erfolgreich kristallisiert. Vor den Messungen wurden die H287A-Kristalle für 25 Sekunden in Kryopuffer (13% PEG 6000, pH 6,0 plus 25% Glycerin) eingetaucht bevor sie an den Goniometerkopf angebracht wurden. Die Struktur der H287A-Mutante wurde bis zu einer Auflösung von 1,07 Å, einem RMSD-Wert für die Bindungslängen von 0,17 Å und für die Bindungswinkel von 1,437 Grad gelöst. Aufgrund der hohen Auflösung der Struktur wurden zunächst die anisotropen Temperaturfaktoren bei der Strukturrechnung berücksichtigt. Dies ergab einen R_{cryst} -Wert von 15,64% und einen R_{free} -Wert von 17,42%. Außerdem wurden die Strukturinformationen der Wasserstoffatome berücksichtigt, woraus sich ein R_{cryst} -Wert von 15,52% und ein R_{free} -Wert von 17,31% ergab.

Der Vergleich der H287A-Struktur mit der Wildtypstruktur ergab einige kleinere Unterschiede, hauptsächlich im aktiven Zentrum des Enzyms (s. Abb. 3.7). Zunächst hat sich die C δ -O ϵ 2-Bindung des Glu37 um 180° gedreht und um 1,17 Å verglichen mit dem Wildtyp verschoben. Das C β -Atom des Ala287 war um 0,44 Å verschoben im Vergleich zum C β -Atom des His287. Das Ca-1 verschob sich bei der H287A-Mutante um 0,35 Å. Außerdem lag das Ser271 in zwei Konformationen vor: Die eine war mit der Wildtypkonformation identisch, bei der zweiten hatte sich das O γ -Atom des Ser271 um 90° gedreht. Schließlich hat sich das O ϵ 2-Atom des Glu21 um 0,59 Å verglichen mit dem Wildtyp verschoben. Dementsprechend hat die Einführung der H287A-Mutation den

stärksten Effekt auf die Glu37-Seitenkette verursacht. Wie schon erwähnt, stabilisiert das Glu37 anscheinend den während der Katalyse positiv geladenen His287-Rest durch elektrostatische Wechselwirkungen. Bei der H287A-Mutante entfällt dieser Effekt, weil keine solche Interaktionen zwischen dem Glutamat und dem Alanin möglich sind.

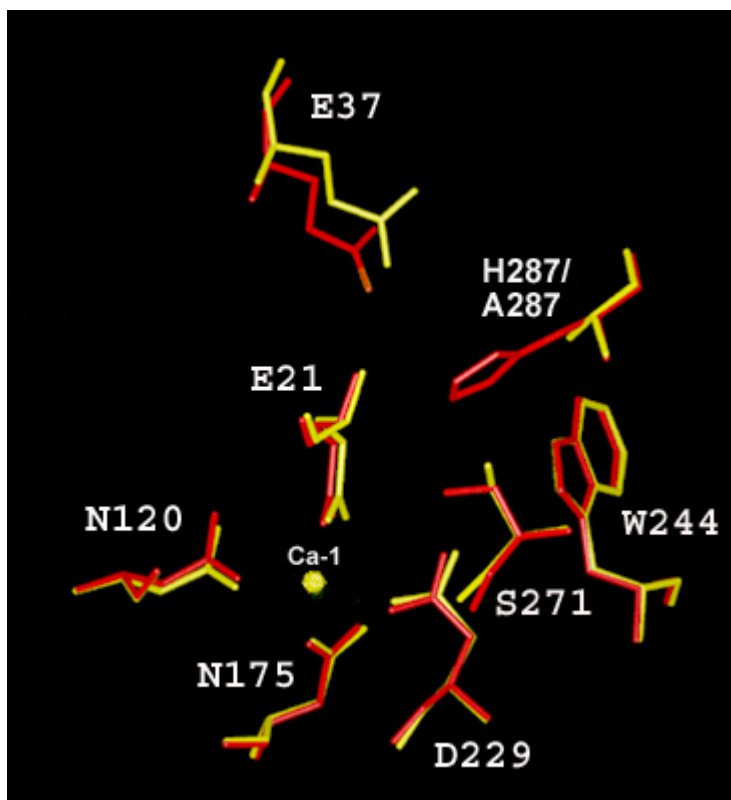


Abb. 3.7: Graphische Darstellung der Ca-1 Bindungsstelle und des aktiven Zentrums sowohl des Wildtyps (rot) als auch der H287A-Mutante (gelb). Das Übereinanderlegen der Reste erfolgte mit dem Programm Insight (MSI, User Guide, 1997).

Da das $O\gamma$ -Atom des Ser271 im Wildtyp 4,1 Å bzw. 3,15 Å vom N δ 1 und N ϵ 2 des His287 entfernt liegt, wäre auch eine Interaktion der beiden Reste miteinander theoretisch möglich. Durch die Verkürzung der Seitenkette an der Position 287 aufgrund des Austausches des Histidins gegen Alanin weist das $O\gamma$ -Atom des Ser271 offensichtlich eine erhöhte Beweglichkeit auf, welche in der Kristallstruktur durch das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Seitenkettenkonformationen in Erscheinung tritt.

Die Analyse aller His287-Mutanten erlaubt folgende Aussagen:

- Die Substratbindung erfolgt nicht nur über elektrostatische Wechselwirkungen des Substrats mit dem Ca-1 und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Trp244 wie bisher angenommen (Scharff, 2000); zusätzlich ist an der Position 287 ein großer hydrophober Rest von erheblicher Bedeutung. Dieser Rest kann sowohl aromatisch als auch aliphatisch sein. Eine polare Seitenkette an der Position 287 führt zur massiven Abnahme der spezifischen Aktivität des Enzyms (H287N, H287D, H287Q). Die Polarität des His287 wird dadurch herabgesetzt, daß es über zwei Wasserstoffbrücken mit Ala20 und Trp244 verbunden ist.
- Eine Wasserstoffbrückenbildung zwischen dem Rest 287 und dem Trp244 ist für die Substratbindung und –umsetzung möglicherweise förderlich (H287W, H287F, H287Y, H287Q), aber nicht unbedingt notwendig (H287L). Die Wasserstoffbrückenbildung zwischen dem Rest 287 und dem Trp244 macht das 287-244-System vermutlich weniger polar und unterstützt dadurch die Interaktion mit dem hydrophoben Substrat DFP.
- Die Protonenabstraktion durch den Rest 287 ist für die katalytische Reaktion nicht zwingend notwendig. Die Aktivitäten der Mutanten H287L, H287W, H287F und H287Y beweisen, dass die Katalyse auch ohne eine Wasseraktivierung durch diese Reste abläuft. Der Wildtyp (His287) weist vermutlich die höchste spezifische Aktivität von allen Mutanten auf, weil das Histidin die Protonenabstraktion durchführt und es dadurch die katalytische Reaktion zusätzlich unterstützt. Ein geladener Rest an der Position 287 (H287N, H287D, H287Q) erhöht die Polarität im aktiven Zentrum, beeinträchtigt vermutlich dadurch die Aktivierung des hydrolytischen Wassermoleküls und hemmt folglich die enzymatische Hydrolyse.

3.2.3 Untersuchung der Rolle von Ser271

Nach dem von Scharff et al. (2001a) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus muß sich der His287-Rest, welcher vor der Katalyse über eine Wasserstoffbrücke zwischen seinem N δ 1-Atom und dem H ϵ 1-Atom des Trp244 und über eine weitere Wasserstoffbrücke

Ergebnisse und Diskussion

zwischen seinem He2 und dem Carbonylsauerstoff des Ala20 verbunden ist, umorientieren, so dass er als Protonenakzeptor fungieren kann. Da die E37Q-Mutante einen Aktivitätsverlust um 50% im Vergleich zum Wildtyp aufweist, scheint es, daß Glu37 durch elektrostatische Wechselwirkungen den umorientierten, doppelt protonierten His287-Ring während der Katalyse stabilisiert. Im aktiven Zentrum der DFPase befindet sich außerdem das Ser271. Eine gleichzeitige Reorientierung von His287, Glu37 und Ser271 könnte eine Konformation erzeugen, die der katalytischen Dyade, analog zur Phospholipase A₂ (Scott et al., 1990), oder der katalytischen Triade, wie bei den Serinproteasen ähnlich ist (Warshel et al., 1989).

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Hydrophobizität kcal/mol	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	0,04	2,1 ± 0,2
S271G	19	10%	0,00	2,0 ± 0,3
S271A (Scharff, 2000)	242	116%	- 0,31	1,8 ± 0,1

Tab. 3.5: Spezifische Aktivität und Calciumgehalt der S271G-Mutante. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind die Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.5). Der TXRF-Wert ist jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden. Die angegebenen Hydrophobizitätswerte sind aus Roseman et al. (1988) entnommen.

Aus sterischen Gründen ist Ser271 die einzige Aminosäure, welche das Phosphoratom des am Ca-1 gebundenen DFP direkt angreifen könnte, indem ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat gebildet wird, wie es in anderen Enzymen beobachtet wurde (Warshel et al., 1989; Collet et al., 1999; Thoden et al., 1998; Lockridge et al., 1997). Im Fall der humanen Butyrylcholinesterase ermöglicht die Substitution einer einzigen Aminosäure dieser Serinprotease, daß Organophosphate über einen nukleophilen Angriff durch eine Serin-Seitenkette im aktiven Zentrum hydrolysiert werden (Lockridge et al., 1997). Eine solche Funktion des Ser271 wurde für die DFPase allerdings ausgeschlossen, da die Mutante S271A um 30% aktiver ist als der Wildtyp. Die erhöhte Aktivität der S271A-Mutante

beweist, dass das Ser271 keinesfalls essentiell für die katalytische Reaktion sein kann, da die für den nukleophilen Angriff erforderliche Hydroxylgruppe in der S271A-Mutante nicht vorhanden ist (Scharff et al., 2001a).

Die Kristallstruktur der S271A-Mutante wies außer dem ausgetauschten Aminosäurerest keine Unterschiede zum Wildtyp auf (Scharff, 2000). Die erhöhte Aktivität der S271A-Mutante wurde folglich mit der Vergrößerung der Substratbindungstasche und der Erhöhung der Hydrophobizität erklärt, da Alanin kleiner und hydrophober ist als Serin. Um diese Annahme zu überprüfen und u. U. die Aktivität des Enzyms noch weiter zu erhöhen, wurde die S271G-Mutante hergestellt (s. Tabelle 3.5).

Die S271G-Mutante enthält zwei Ca-Atome und weist eine um 90% niedrigere spezifische Aktivität als das Wildtyp-Enzym auf. Dieser enorme Aktivitätsverlust zeigt, dass der Rest 271 doch an der Katalyse beteiligt sein muß. Dies bestätigt auch der Befund, dass die Einführung der S271A-Mutation trotz Aktivitätserhöhung die Affinität des Enzyms für das DFP verringert, wie die kinetischen Untersuchungen gezeigt haben (s. Abschn. 3.4.1). Sowohl das Serin als auch das Alanin sind hydrophober als Glycin. Wahrscheinlich ist die Hydrophobizität des Restes an der Position 271 für die Substratbindung und –umsetzung doch von Bedeutung. Allerdings könnte der Aktivitätsverlust der S271G-Mutante auch auf konformationelle Veränderungen im aktiven Zentrum des Enzyms zurückzuführen sein. Da uns keine Kristallstruktur dieser Mutante vorliegt, kann diese Möglichkeit jedoch nicht weiter diskutiert werden.

3.2.4 Mutationen zur Untersuchung der Rolle von Aminosäureresten in der Substratbindungstasche der DFPase

Zur Untersuchung der Rolle verschiedener Aminosäurereste in der Substratbindungstasche der DFPase an der Katalysereaktion wurden gezielt Mutationen eingeführt, welche die Vergrößerung der Bindungstasche einerseits und die Erhöhung der Hydrophobizität andererseits erzielen sollten. Hierbei wurde angenommen, daß eine größere Bindungstasche eventuell zur Erhöhung der Katalyserate führen könnte. Da bisher kein

stark bindender Inhibitor für das Tintenfischenzym gefunden werden konnte, wurde die mögliche Position des DFP-Substrats mit Hilfe von Modellierungs- und Energieminimierungsexperimenten bestimmt (Scharff et al, 2000). Während die eine Isopropylgruppe sich anfangs zwischen den hydrophoben Seitenketten von Phe173 und Trp244 und im Laufe der Minimierungsrechnungen näher zum Trp244 orientierte, befand sich die andere Isopropylgruppe zwischen dem hydrophoben Ring von Pro36 und der Seitenkette von Ala74. Auch im Fall der Phosphotriesterase aus *P. diminuta*, welche ebenfalls DFP, Sarin, Soman und Tabun hydrolysiert, enthält die Substratbindungstasche hauptsächlich hydrophobe Seitenketten, welche an der Substratbindung beteiligt sind (Watkins et al., 1997).

3.2.4.1 Effekte von Ladung und Größe verschiedener Seitenketten

Um die Substratbindungstasche zu vergrößern, wurden Reste mutiert, welche sich in unmittelbarer Nähe der mit den Isopropylgruppen wechselwirkenden Aminosäuren befinden und große Seitenketten besitzen. Somit wurden die Mutanten R146S, Y144S, M148A und T195A erzeugt (s. Abb. 3.8). Die Expression und Aufreinigung dieser Mutanten erfolgte nach der für den Wildtyp beschriebenen Prozedur (s. Abschn. 2.4.1, 2.4.3). Hierbei war die Kurzlebigkeit der R146S-Mutante im Vergleich zu den anderen Mutanten und zum Wildtyp besonders auffällig. Während der Wildtyp für über sechs Monate bei 4 °C stabil ist und keinen Aktivitätsverlust aufwies, aggregierte die R146S-Mutante schon nach zweiwöchiger Aufbewahrung bei 4 °C. Da uns keine strukturellen Informationen über diese Mutante vorliegen, kann keine Aussage über den Effekt der eingeführten Mutation auf die Tertiärstruktur des Proteins gemacht werden. Allerdings lässt die Instabilität der Mutante die Vermutung zu, dass die Mutation zu weitergehenden strukturellen Veränderungen geführt haben könnte.

Die R146S-Mutante wies eine um 45% im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte spezifische Aktivität auf. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die positive Ladung des Arginins durch Anziehung des Substrats eine Rolle an der Substratbindung spielt. Tritt jedoch tatsächlich eine Dimerisierung der R146S-Mutante auf (s. Abschn. 3.1), so wäre es auch

Ergebnisse und Diskussion

möglich, daß die Absenkung der Katalyserate hierauf beruht. Im Fall der Y144S-Mutante entsprach die spezifische Aktivität im Wesentlichen der des Wildtyps, was darauf schließen lässt, dass dieser Rest nicht direkt an der Substratbindung beteiligt ist. Der Austausch des Met148 gegen Alanin führte zur einer Verringerung der spezifischen Aktivität um 26% verglichen mit der Wildtyp-DFPase (s. Tab. 3.6). Alanin besitzt zwar eine kleinere Seitenkette als Methionin, ist aber gleichzeitig weniger hydrophob (Black & Mould, 1991). Die niedrigere Hydrolyserate dieser Mutante unterstreicht die Rolle der Hydrophobizität der Reste in der Bindungstasche des Enzyms.

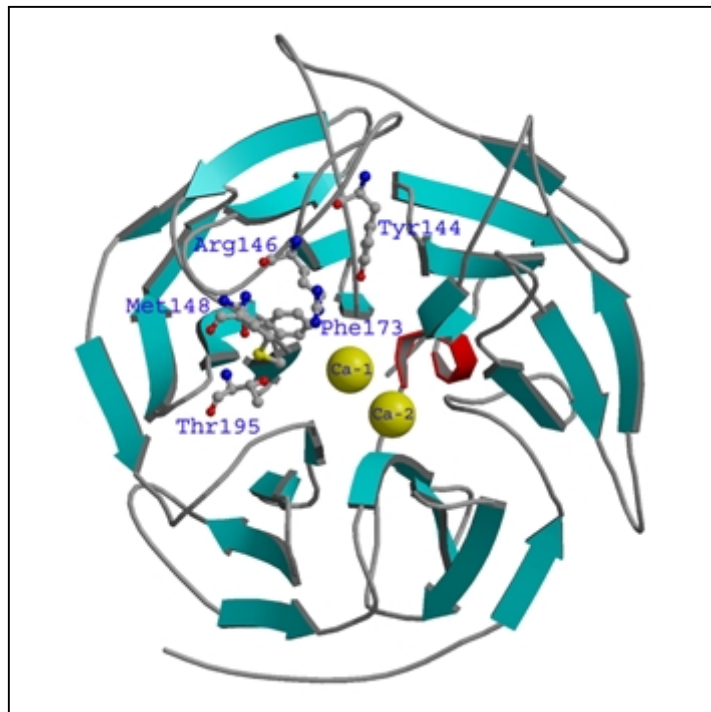


Abb. 3.8: Graphische Darstellung der Positionen der zur Vergrößerung der Substratbindungstasche mutierten Reste. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erzeugt (Koradi et al., 1996).

Der Austausch des Thr195 gegen die hydrophoberen Valin- bzw. Leucin-Reste hatte keinen nennenswerten Effekt auf die spezifische Aktivität der DFPase. Im Gegensatz hierzu führte der Austausch des Threonins gegen den deutlich kleineren aber weniger hydrophoben Alanin-Rest zu einer Erniedrigung der Hydrolyserate um 60% verglichen mit

Ergebnisse und Diskussion

dem Wildtyp-Enzym. Es scheint daher, daß die Größe der Seitenkette auch hier einen Einfluss auf die Substratbindung hat und dass ein großer hydrophober Rest eine bessere Substratumsetzung bewirkt als eine kleine hydrophobe Seitenkette.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	2,1 ± 0,2
R146S	106	55%	2,1 ± 0,3
Y144S	209	108%	2,2 ± 0,3
M148A	143	74%	1,9 ± 0,2
T195L	173	89%	1,9 ± 0,2
T195V	188	97%	2,2 ± 0,3
T195A	78	40%	1,6 ± 0,3

Tab. 3.6: Spezifische Aktivitäten und Calciumgehalte der Mutanten an der Substratbindungsstelle. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Mutanten zeigen, dass die Hydrophobizität der Bindungstasche anscheinend wichtiger als ihre Größe ist. Die Einführung von weniger hydrophoben Resten an diesen Positionen verringert meist die Substrataffinität. Denselben Effekt, also die Erniedrigung der Substrataffinität, hatte auch der Austausch des in der Bindungstasche liegenden hydrophoben Tryptophan-Restes gegen Alanin bei der Phosphotriesterase aus *P. diminuta* (Watkins et al., 1997). Gleichzeitig scheint jedoch die positive Ladung des Arg146 einen direkten Einfluß auf die Substratbindung oder die Proteinstruktur zu haben.

3.2.4.2 Untersuchung der Rolle von Phe173

Wie die Minimierungs- und Modellierungsexperimente des DFP in der DFPase gezeigt haben, weisen die aromatischen Ringsysteme von Phe173 und Trp244 eine nahezu parallele Anordnung auf, deren Zwischenraum einer hydrophoben Tasche ähnelt. Allerdings wurde im Verlauf der Minimierungsrechnungen beobachtet, dass sich die zwischen diesen beiden Resten platzierte Isopropylgruppe des DFP vom Phe173 weg zum Trp244 hin orientierte (Scharff, 2000). Eine frühere Untersuchung der Rolle des Trp244 hatte gezeigt, dass dieser Rest vermutlich sowohl über polare als auch über hydrophobe Wechselwirkungen an der DFP-Hydrolyse partizipiert. Außerdem war bei der Charakterisierung der Kristallstruktur des Wildtyps aufgefallen, dass die hydrophobe Phe314-Seitenkette des einen Proteinmoleküls in das aktive Zentrum des benachbarten Proteinmoleküls hineinragt und sich nahezu parallel zum Trp244-Ringsystem positioniert, was darauf hindeutet, dass hydrophobe Wechselwirkungen der Trp244-Seitenkette auch mit einer Isopropylgruppe des DFP möglich sind (Scharff et al., 2001a).

Zur Untersuchung der Rolle der Hydrophobizität und der Seitenkettengröße in der Position 173 wurden die Mutanten F173L, F173W, F173Y, F173V, F173A und F173S erzeugt (s. Tabelle 3.7). Wie aus der Analyse der spezifischen Aktivitäten ersichtlich wird, nimmt die Aktivität der Mutanten mit abnehmender Hydrophobizität der Aminosäureseitenketten (Phe/Trp>Leu>Val>Tyr>Ala) ab. Zwar besitzt die F173Y-Mutante eine etwas niedrigere spezifische Aktivität als die F173V-Mutante, obwohl Tyrosin leicht hydrophober als Valin ist. Diese Diskrepanz widerspricht der Rolle der Hydrophobizität in der Position 173 jedoch nicht, weil erstens die Hydrophobizitätsdifferenz nach Rosemann et al. sehr gering und zweitens der Unterschied der Aktivitäten dieser beiden Mutanten ebenfalls sehr klein ist und im Rahmen des Messfehlers liegt. Der große Aktivitätsverlust der F173A-Mutante um 84% verglichen mit dem Wildtyp hingegen kann einerseits der niedrigen Hydrophobizität des Alanins zugeschnitten werden. Andererseits könnte die Einführung der Alanin-Seitenkette an der Stelle des Phe173, welches mit dem Trp244-Ring über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert, zu einer Reorientierung des Indolrings des Trp244 führen, wie es bei der Phosphotriesterase aus *P. diminuta* beobachtet worden ist (Goodspeed et al., 2001). Da das Trp244 an dem katalytischen Mechanismus direkt

Ergebnisse und Diskussion

beteiligt ist (Scharff et al., 2001a), könnte eine solche Reorientierung ebenfalls zum Aktivitätsverlust der F173A-Mutante führen. Die deutlich höhere spezifische Aktivität der F173S-Mutante im Vergleich zur F173A-Mutante entspricht allerdings nicht dem hier aufgestellten Hydrophobizitätsschema. Jedoch spricht die deutliche Abnahme der spezifischen Aktivität der F173Y-Mutante gegenüber dem Wildtyp, bedingt durch die Einführung von nur einer Hydroxylgruppe, dafür, dass dem hydrophoben Charakter dieser Seitenkette schon eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung zukommt.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Hydrophobizität kcal/mol	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	- 2,27	2,1 ± 0,2
F173W	158	81%	- 2,13	2,3 ± 0,3
F173L	143	72%	- 1,82	1,9 ± 0,3
F173Y	92	47%	- 1,47	2,1 ± 0,2
F173V	105	54%	- 1,30	2,0 ± 0,1
F173A	31	16%	- 0,39	2,2 ± 0,2
F173S	63	32%	1,24	1,9 ± 0,3

Tab. 3.7: Spezifische Aktivitäten und Calciumgehalte der Phe173-Mutanten. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind Mittelwerte aus pH-Stat und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden. Die angegebenen Hydrophobizitätswerte sind aus Roseman (1988) entnommen.

Wie aus Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, schwanken die spezifischen Aktivitäten der Mutanten F173Y und F173S sehr stark in Abhängigkeit von der zur Aktivitätsbestimmung verwendeten Meßmethode. So beträgt die mittels pH-Stat-Messungen ermittelte spezifische Aktivität der F173Y-Mutante 65% der spezifischen Aktivität des Wildtyps, während die mittels Fluoridmessungen bestimmte spezifische Aktivität nur 30% der spezifischen Aktivität des Wildtyps entspricht. Weiterhin beträgt die mittels pH-Stat-Messungen ermittelte spezifische Aktivität der F173S-Mutante 43%, die mittels

Fluoridmessungen nur 22% im Vergleich zum Wildtyp. Wie im Fall der H287Q-Mutante (s. Abschn. 3.2.2.3), ist diese Diskrepanz vermutlich darauf zurückzuführen, daß die bei den Fluoridmessungen herrschende Ionenstärke zu einer weniger spezifischen Bindung des Substrats an das Enzym führt. Betrachtet man die durch die pH-Stat-Messungen bestimmten spezifischen Aktivitäten der beiden Mutanten, so besitzt die hydrophobere F173Y-Mutante eine höhere spezifische Aktivität als die hydrophile F173S-Mutante.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der sechs Phe173-Mutanten weisen darauf hin, dass ein hydrophober Rest an der Position 173 förderlich für die Substratbindung und -umsetzung ist. Die Positionierung der Isopropylgruppe des DFP in der durch Phe173 und Trp244 ausgebildeten hydrophoben Tasche, wie es in der Wildtyp-DFPase der Fall zu sein scheint, führt wahrscheinlich zu einer maximalen Katalyserate. Das Vorhandensein eines weniger hydrophoben Restes an der Position 173 resultiert hingegen in einer Abnahme der Aktivität.

3.2.5 Untersuchung des Ca-2-Liganden Asp232

Das hochaffine Ca-Ion der DFPase (Ca-2) befindet sich im Inneren des zentralen Tunnels des Enzyms, 10 Å vom Ca-1 entfernt und besitzt einen B-Faktor von 9,5 Å². Es weist eine Dissoziationskonstante von weniger als 5.3 nM auf, was darauf zurückzuführen ist, dass das Ca-2 aufgrund seiner abgeschirmten Position dem umgebenden Lösungsmittel nur schwer zugänglich ist (Hartleib et al., 2001, Scharff et al., 2001a). Ca-2 wird vom Oδ2 der Asp232-Seitenkette, dem Nδ1 der His274-Seitenkette, dem Carbonylsauerstoff von Leu273 und den drei Wassermolekülen WAT48, WAT120 und WAT283 in Form eines leicht verzerrten Oktaeders koordiniert (s. Abb. 3.9) (Scharff et al., 2001a). Außerdem bestehen Wasserstoffbrücken zwischen den drei Wassermolekülen und den Sauerstoffatomen von Pro23, Gln77 und Met231 im Proteinerückgrat. Zusätzlich koordiniert WAT283 mit einem Carboxylsauerstoff der Asp272-Seitenkette, während WAT120 über ein weiteres Wassermolekül mit einem Sauerstoffatom der Asp121-Seitenkette wechselwirkt.

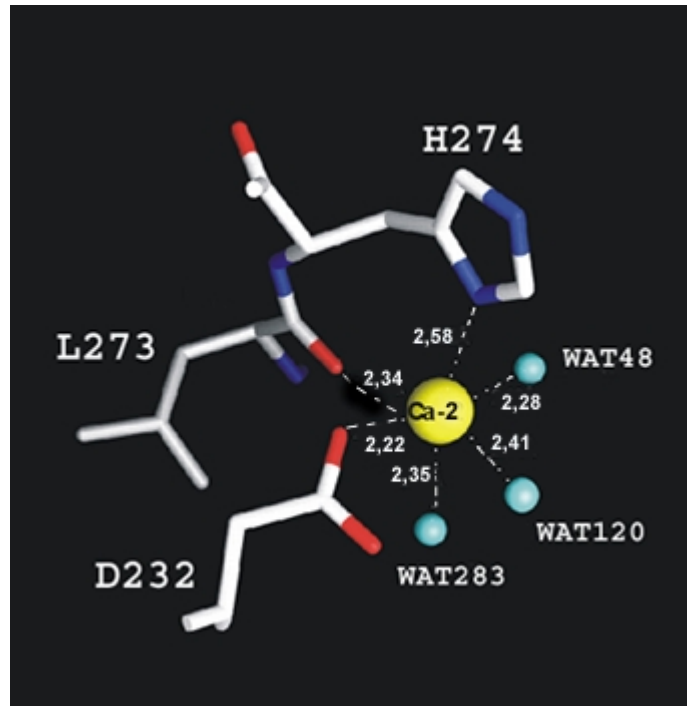


Abb. 3.9: Räumliche Anordnung der Liganden in der Ca-2-Bindungsstelle. Die Koordinationsabstände zum Ca-2 Ion sind in Å angegeben [entnommen aus Scharff et al., 2001a].

Es ist gezeigt worden, dass das Ca-2 für die Strukturstabilität der DFPase verantwortlich ist, und zwar wahrscheinlich dadurch, dass seine Sauerstoffatom-Liganden (in drei Fällen über Wassermoleküle vermittelt) zu unterschiedlichen Propeller-Blättern gehören. Eine analoge Funktion wurde für ein hochaffines Ca-Atom der Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* beschrieben (Ha et al., 2000). Calcium hat einen stabilisierenden Effekt auf die Proteinstrukturen vieler Proteine, wie Proteinase K, Thermolysin und α -Lactalbumin (McPhalen et al., 1991; Bryant et al., 1984); allerdings führt in diesen Fällen der Zusatz von Calcium zum denaturierten Protein zur vollständigen Renaturierung. Eine durch Ca-Entzug hervorgerufene irreversible Denaturierung, wie bei der DFPase, ist eher selten und wurde ansonsten nur für wenige Proteine beschrieben, wie die α -Amylase (Lecker et al., 1998) und die Hybrid-*Bacillus* 1,3-1,3- β -Glucanase (Keitel et al., 1994). Der Entzug von Calcium führt aber auch bei der Säugetier-Paraoxonase (PON; EC 3.1.8.1) (Kuo & La Du, 1995; Gonzalvo et al., 1998, Sogorb et al., 1999) zur irreversiblen Denaturierung und Inaktivierung des Enzyms. Die Funktion der Ca-Ionen ist in der

Ergebnisse und Diskussion

DFPase und der PON sehr ähnlich. Auch die PON besitzt zwei Ca-Ionen: Das erste befindet sich in dem aktiven Zentrum des Proteins, und sein Entzug führt zur reversiblen Inaktivierung des Enzyms. Das zweite Ion stabilisiert die Struktur; Entzug dieses Ca-Ions führt zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms (Kuo & La Du, 1998).

Eine H274N-Mutation führte zu einer geringfügigen Abnahme der spezifischen Aktivität der DFPase (s. Tab. 3.8). Die Einführung dieser Mutation könnte zur Veränderung der Proteinkonformation geführt haben (Hartleib, 2000) und die verringerte spezifische Aktivität der Mutante auf eine Beteiligung dieses Restes am Wasserstoffbrückennetzwerk beruhen. Wie die kinetischen Untersuchungen dieser Mutante zeigten (s. Abschn. 3.4.1), wies sie eine um 50% höhere Katalysegeschwindigkeit bei gleichbleibender Michaelis-Konstante auf, was ebenfalls mit einer Beteiligung dieses Restes an dem Wasserstoffbrückennetzwerk im zentralen Tunnel des Enzyms zusammenhängen kann.

Zur Untersuchung der Rolle der negativen Ladung des Asp232-Restes an der Ca-2-Bindungsstelle wurde die Mutante D232S erzeugt (s. Tab. 3.8). Durch die Einführung des Serin-Restes besteht in der Umgebung von Ca-2 ein anderes Ladungsverhältnis als im Wildtyp. Dies könnte u. U. über das im zentralen Tunnel des Enzyms bestehende Wasserstoffbrückennetzwerk (s. Abschn. 3.2.6) Auswirkungen auf das Ca-1 und somit auf die Katalyse haben.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	2,1 ± 0,2
H274N (Hartleib, 2000)	180	93%	2,0 ± 0,2
D232S	200	103%	2,0 ± 0,3

Tab. 3.8: Spezifische Aktivitäten und Calciumgehalte der Mutanten an der Ca-2-Bindungsstelle. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind die Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden.

Ergebnisse und Diskussion

Die D232S-Mutante besitzt gemäß den TXRF-Messungen zwei Ca-Ionen und die gleiche spezifische Aktivität wie das Wildtyp-Enzym. Da die verursachte Veränderung an der Ca-2-Bindungsstelle einen strukturellen Effekt in der Mutante hervorgerufen haben könnte, wurden mittels NMR eindimensionale Protonenspektren zum Vergleich mit dem Wildtyp aufgenommen (s. Abschn. 2.7). Die Spektren zeigten, dass die Struktur der D232S-Mutante der Struktur der nativen DFPase entspricht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz des Verlustes der Carboxylgruppe als Koordinationspartner des Ca-2 die Struktur und die Aktivität des Proteins erhalten geblieben sind. Zur weiteren strukturellen Charakterisierung der D232S-Mutante wurde diese in 13% PEG 6000 und 0,1M MES (pH 6,0) kristallisiert. Vor den Messungen wurden die D232S-Kristalle für 30 Sekunden in Kryopuffer (Kristallisationspuffer plus 25% Glycerin) eingetaucht und anschließend am Goniometerkopf angebracht. Die Struktur der D232S-Mutante wurde bis zu einer Auflösung von 1,1 Å, einem RMSD-Wert für die Bindungslängen von 0,08 Å und für die Bindungswinkel von 1,449 Grad gelöst. Da die Auflösung dieser Mutante sehr hoch war, wurden zunächst die anisotropen Temperaturfaktoren bei der Strukturrechnung berücksichtigt. Diese Berechnung ergab einen R_{cryst} -Wert von 15,65% und einen R_{free} -Wert von 18,12%. Außerdem wurde zur Verbesserung der beiden R-Werte versucht, die Strukturinformationen der Wasserstoffatome zu berücksichtigen, wodurch sich ein R_{cryst} -Wert von 15,45% und ein R_{free} -Wert von 17,93% ergab.

Die räumliche Anordnung der Ca-2-Bindungsstelle sowohl im Wildtyp als auch in der D232S-Mutante ist in Abb. 3.10 dargestellt. Verglichen mit dem Wildtyp hat sich das N δ 1-Atom des His274 bei der D232S-Mutante um 0,5 Å und der Carbonylsauerstoff des Leu273 um 1,14 Å verschoben. Außerdem hat sich die Isopropylgruppe des Leu273 um ca. 120 ° gedreht und das C β -Atom des Asp232 liegt 0,74 Å vom C β -Atom des Ser232 entfernt. Beim Gln304, welches im Wildtyp über eine Wasserstoffbrücke mit WAT120 verbunden ist, hat sich die Amidgruppe in der Seitenkette um 90 ° gedreht, so dass es jetzt vom WAT120 5,5 Å entfernt ist und dadurch keine Wasserstoffbrücke mehr bildet. Ähnlich hat sich beim Gln77, welches im Wildtyp ebenfalls über eine Wasserstoffbrücke

mit dem WAT120 verbunden ist, die Bindung zwischen C δ und N ϵ 2 um 90 ° gedreht und N ϵ 2 liegt in der D232S-Mutante 4,01 Å vom WAT120 entfernt, wodurch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke ausgeschlossen ist. Dafür besteht in der D232S-Mutante eine Wasserstoffbrücke zwischen dem O δ 1-Atom des Asn272 und dem WAT283. Außerdem liegt das Ser232 in zwei Konformationen vor (s. Abb. 3.10). In der zweiten Konformation ist das O γ des Ser232 um ca. 120 ° gedreht. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass durch die Substitution des Asp232 gegen Serin eine größere Unordnung in der Ca-2 Bindungsstelle herrscht, welche anscheinend einen strukturellen Effekt auf die Ca-2 Koordination hat.

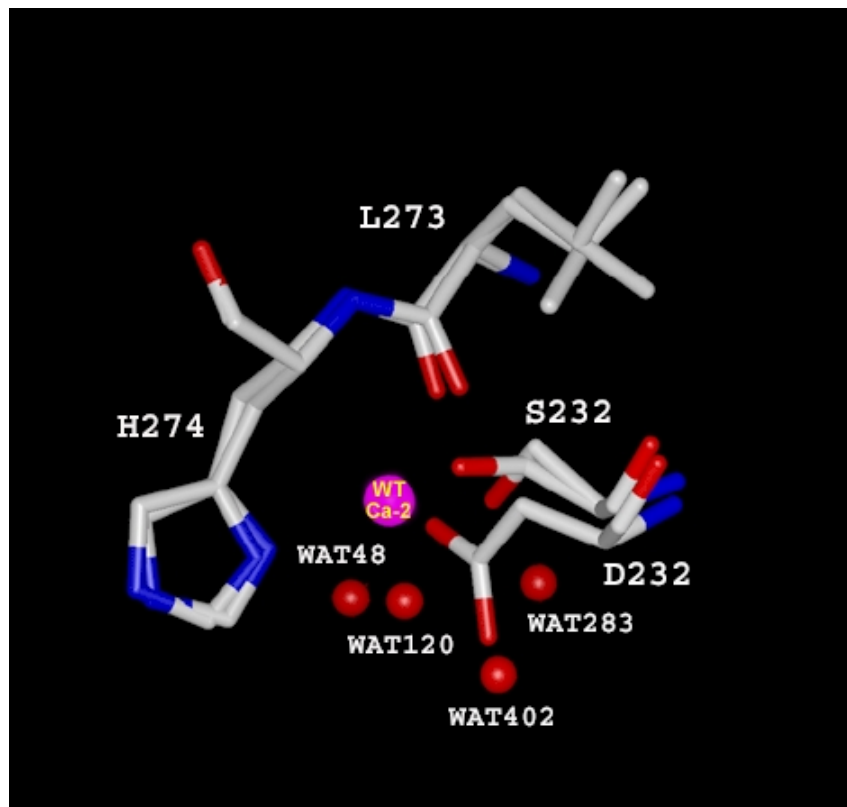


Abb. 3.10: Räumliche Anordnung der Liganden an der Ca-2-Bindungsstelle sowohl im Wildtyp als auch in der D232S-Mutante. Es ist anzumerken, dass das Ca-2 (in der Abbildung als "WT Ca-2" bezeichnet) nur in der Struktur des Wildtyps detektiert wurde. Analog war das WAT402 nur in der Struktur der D232S-Mutante zu sehen. Das Übereinanderlegen der Reste erfolgte mit dem Programm Insight (MSI, User Guide, 1997).

Ergebnisse und Diskussion

Trotz intensiver Suche und genauer Überprüfung der Temperaturfaktoren und der positiven Differenzdichten konnte in der Struktur der D232S-Mutante das Ca-2 nicht detektiert werden. An der Position, wo im Wildtyp-Enzym das Ca-2 auftritt, war keine Differenzdichte vorhanden. Stattdessen wurde in der Nähe vom WAT120 und WAT283 das WAT402, welches in der Wildtypstruktur nicht existiert, detektiert. Das WAT402 besitzt einen Temperaturfaktor von $11,5 \text{ \AA}^2$ und liegt $4,89 \text{ \AA}$ vom N δ 1 des His274, $3,82 \text{ \AA}$ vom WAT283, $3,61 \text{ \AA}$ vom WAT120, $2,85 \text{ \AA}$ vom O γ des Ser232 und $6,36 \text{ \AA}$ vom WAT48 entfernt. Diese Daten zeigen, dass es sich beim WAT402 nicht um das Ca-2 handeln dürfte. Die Untersuchung aller Wassermoleküle in der unmittelbaren Umgebung der ursprünglichen Ca-2 Liganden ergab, dass basierend auf den Abständen und Temperaturfaktoren keines dieser Wassermoleküle ein Ca-Ion sein sollte.

Obwohl in der Kristallstruktur der D232S-Mutante kein zweites Ca-Ion detektiert werden konnte, ergaben die TXRF-Messungen der Mutante, dass zwei Ca-Ionen pro Proteinmolekül enthalten sind. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass in dieser Mutante auch das zweite Ca-Ion niederaffin gebunden ist, allerdings nicht an der Ca-2-Bindungsstelle. Dass die DFPase weitere niederaffine Metallbindungsstellen besitzt, konnte in den Metallaustauschexperimenten gezeigt werden (s. Abschn. 3.5). Die Tatsache, dass alle DFPase-Mutanten, welche eine native Struktur besitzen, immer zwei Ca-Ionen enthalten, widerspricht jedoch dem Befund, dass der D232S-Mutante das Ca-2 Ion fehlen soll und sie trotzdem eine native Struktur besitzt. Dass der Entzug des Ca-2 Ion zum Zerfall der Struktur der DFPase führt, wurde schon zuvor durch verschiedene Experimente nachgewiesen (Hartleib et al., 2001).

Eine andere Erklärung für die Abwesenheit der Elektronendichte an der ursprünglichen Position des Ca-2 in der D232S-Mutante könnte sein, dass dieses Ca-Ion - aufgrund der mangelnden Koordination im Vergleich zum Wildtyp – ungeordnet vorliegt und somit in der Kristallstruktur nicht exakt lokalisiert werden kann. Diese Annahme wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass das Ser232 in zwei Konformationen vorliegt, was eine feste Koordination des Ca-2 Ions erschwert. Um dieser Frage im Rahmen der Kristallisationsexperimente nachzugehen, müsste eine neue Messung an der Ca-

Ergebnisse und Diskussion

Absorptionskante durchgeführt werden, damit man mit Hilfe einer anormalen Differenz-Fourier-Rechnung feststellen kann, ob einige der als Wasser interpretierten Elektronendichten eventuell doch von dem Ca-Ion stammen.

Aus den Untersuchungen der D232S-Mutante ergibt sich die Frage, wie es möglich ist, dass diese Mutante dieselbe Aktivität wie der Wildtyp aufweist und eine native Struktur besitzt, obwohl das für die Strukturstabilität essentielle Ca-2 anscheinend nicht an der zu erwartenden Position lokalisiert ist? Die Ca-2 Koordination über das N δ 1 der His274-Seitenkette im Wildtyp ist recht ungewöhnlich, da Ca-Atome in Proteinen üblicherweise durch Sauerstoffatome koordiniert werden (Nayal et al., 1994, McPhalen et al., 1991). Nur bei wenigen Proteinen wurde bisher eine solche Ca-N Koordination beobachtet, wie beispielsweise der Exoamylase aus *P. stutzeri*, wo ebenfalls eine Histidinseitenkette direkt mit einem Ca-Ion koordiniert ist (Morishita et al., 1997). Außerdem wird das Ca-2 im Wildtyp der DFPase von nur drei Proteinliganden koordiniert und ist somit u. U. weniger fest gebunden als das Ca-1. Auf eine erhöhte Beweglichkeit des Ca-2 weist auch dessen höherer B-Faktor von 9,5 Å hin, während das Ca-1 einen B-Faktor von nur 7,7 Å hat. Dadurch, dass der eine dieser drei Proteinliganden ein Stickstoffatom ist, ist die koordinative Bindung zusätzlich schwächer, was ebenfalls zur höheren Beweglichkeit von Ca-2 beitragen kann. Durch die Einführung der D232S-Mutation wird ein Ligand nun gänzlich eliminiert, was die präzise Bindung eines Ca-Ions an der Ca-2 Bindungsstelle offensichtlich deutlich erschwert.

Die Rolle des Ca-2 bei der Stabilisierung der Tertiärstruktur der DFPase wurde anhand der Röntgenstruktur damit begründet, dass die an der Koordination des Ca-2 beteiligten Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken mit den Sauerstoffatomen von Seitenketten verbunden sind, die alle aus unterschiedlichen Modulen des β -Propellers stammen (Scharff, 2000). Allerdings gehört jede der das Ca-1 koordinierenden Aminosäureseitenketten ebenfalls zu einem anderen Modul des β -Propellers, was die Annahme erlaubt, dass das Ca-1 ebenfalls an der Strukturstabilität beteiligt sein könnte. Dies ist jedoch mit Hilfe von zielgerichteten Mutationen bereits widerlegt worden (Scharff et al., 2001a).

Da sich die spezifische Aktivität der D232S-Mutante von der des Wildtyps kaum unterscheidet, sind auch keine nennenswerten strukturellen Veränderungen im aktiven Zentrum der Mutante zu erwarten. Tatsächlich hat sich nur beim Ser271 das O γ -Atom um 120° gedreht und liegt in der D232S-Mutante 4,52 Å vom N δ 1 des His287 entfernt, während beim Wildtyp diese Distanz 4,01 Å beträgt (s. Abb. 3.11).

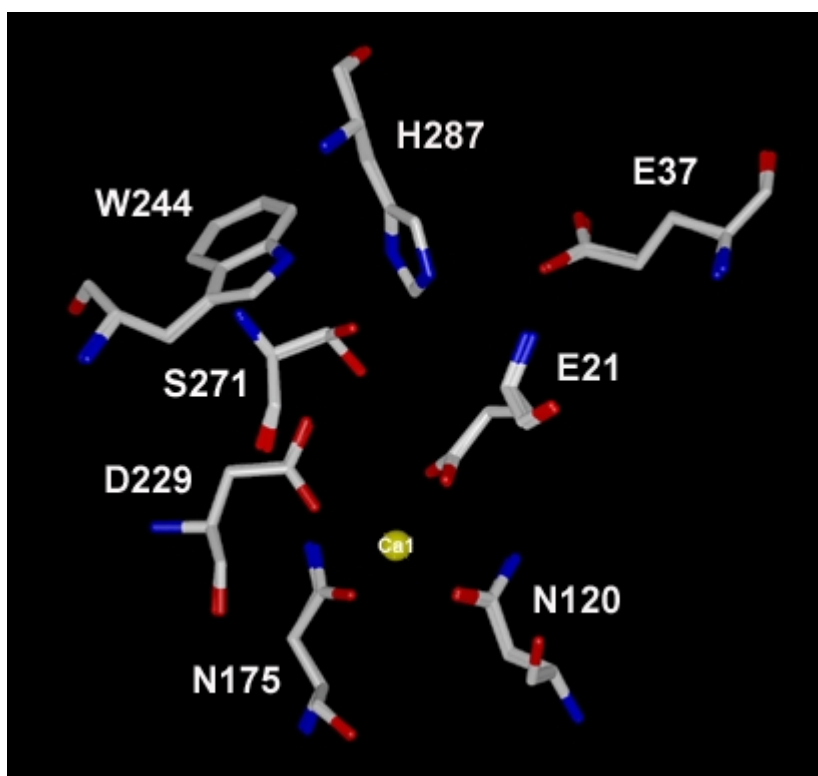


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der Ca-1 Bindungsstelle und des aktiven Zentrums sowohl des Wildtyps als auch der D232S-Mutante. Das O γ des Ser271 zeigt beim Wildtyp nach unten. Das Übereinanderlegen der Reste erfolgte mit dem Programm Insight (MSI, User Guide, 1997).

Die D232S-Mutante weist sehr interessante Eigenschaften auf, da das aktive Zentrum durch die Einführung der Mutation nur unwesentlich beeinflusst worden ist, während stärkere Veränderungen an der Ca-2 Bindungsstelle festzustellen waren. Der wichtigste Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante ist, dass sich in der Struktur der D232S-Mutante kein Ca-2 Ion detektieren ließ, sie trotzdem aber eine intakte Tertiärstruktur aufwies. Dies erlaubt die Annahme, dass die DFPase zwar ein Ca-Ion für

die Enzymaktivität benötigt, sie aber auch eine intakte Struktur aufweisen kann, ohne dass das Ca-2 Ion exakt in der Position, in der es in der Wildtypstruktur lokalisiert ist, vorhanden sein muß.

3.2.6 Einfluss des Wasserstoffbrückennetzwerks im zentralen Tunnel der DFPase auf die Katalyse

Die Wildtyp-Kristallstruktur der DFPase zeigt, dass die das Ca-2 koordinierenden Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken mit den Carbonylsauerstoffatomen im Rückgrat der Reste Pro23, Gln77 und Met231 verbunden sind. Außerdem ist das WAT283 (Ca-2 Ligand) mit Asn272 und das WAT120 (ebenfalls Ca-2 Ligand) mit Gln304 über Wasserstoffbrücken verbunden. Das Asn272, welches zwischen Ca-1 und Ca-2 positioniert ist, koordiniert außerdem das WAT44, welches ein Ca-1 Ligand ist. Es ist also anzunehmen, dass im zentralen Tunnel der DFPase ein Wasserstoffbrückennetzwerk besteht, über welches die zwei Calciumionen trotz ihres Abstands von über 10 Å wechselwirken können (s. Abb. 3.12, 3.13 & Tab. 3.9). Die erniedrigte Aktivität der E37Q- und H181N-Mutanten, (s. Abschn. 3.4.1), welche am Anfang bzw. am Ende des Tunnels positioniert sind, deutet ebenfalls auf die Existenz dieses Wasserstoffbrückennetzwerks hin. Bei vielen Proteinen trägt ein Wasserstoffbrückennetzwerk zur Stabilisierung der Gesamtstruktur des Proteins und/oder des aktiven Zentrums bzw. der Metallionenbindungsstelle bei (Davis et al., 1994; Petersen & Shuman, 1997; Yuan et al., 1999). Beispielweise ist die Struktur des aktiven Zentrums sowie des binuklearen Metallzentrums in der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (PTE) von derartigen Wasserstoffbrücken abhängig. So führt die Substitution von D253 der PTE, das eine Wasserstoffbrücke zu dem Metallliganden H230 ausbildet, durch einen Aminosäurerest, der keine Wasserstoffbrücke ausbilden kann, zu einer 500fachen Abnahme der Enzymaktivität. Diese Wechselwirkung dient offensichtlich der Ausrichtung des Histidinrestes, um eine optimale Koordination des exponierten Zinkions zu erhalten (Kuo et al., 1997). Ähnliches gilt für das aktive Zentrum der Acetylcholinesterase, das ebenfalls durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert wird (Ordentlich et al., 1993). Auch im Fall der Phospholipase A₂ (PLA₂) führt die Auflösung des Wasserstoffbrückennetzwerks durch

Mutation des D99 zu einer verlangsamten Bildung des Übergangszustands, da die katalytische Diade (H48-D99) zur Stabilisierung der positiven Ladung nicht mehr existiert (Sekar et al., 1997). Bei der humanen Stickstoffmonoxid-Synthase aus Endothelzellen ist ein Wasserstoffbrückennetzwerk für die Ausbildung des aktiven Zentrums der Oxygenase-Domäne von erheblicher Bedeutung (Chen et al., 2003). Weiterhin ist im aktiven Zentrum der *E.coli* DNA-Polymerase I ein 18 Å langes Wasserstoffbrückennetzwerk für die Bindung von Templat-Oligonukleotiden in der richtigen, katalytisch kompetenten Orientierung essentiell (Singh et al., 2003).

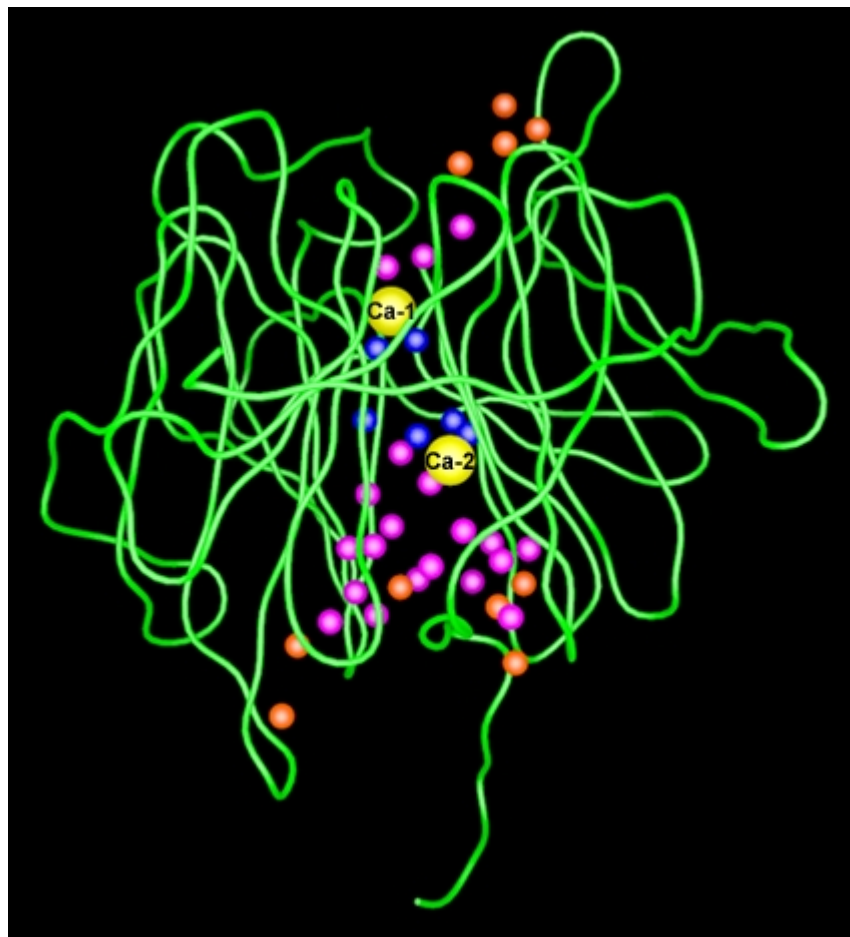


Abb. 3.12: Darstellung des Kohlenstoffrückgrates der Wildtyp-DFPase, der beiden Calciumatome und der Wassermoleküle, die sich im Tunnel der DFPase befinden. In Blau sind die Wassermoleküle dargestellt, die einen B-Faktor zwischen 5-6 Å² besitzen; in Magenta die Wassermoleküle mit einem B-Faktor zwischen 6 und 10 Å² und in Rot die Wassermoleküle mit einem B-Faktor zwischen 10 und 15 Å². Die Abbildung wurde mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) erzeugt.

Ergebnisse und Diskussion

Donor	Distanz (Å)	Akzeptor
G19 H	2,11	N290 OD1
G22 H	2,04	E21 Oε1
C76 H	2,11	WAT614
Q77 Hε22	2,15	C76 O
C78 H	2,10	WAT505
N120 Hδ21	2,23	WAT511
C122 H	2,12	D121 OD1
F124 H	2,09	Q77 Oε1
Y126 H	2,08	H181 Nε2
N175 Hδ21	2,19	WAT524
N175 Hδ22	2,15	T195 Oγ
I177 H	2,24	WAT501
V179 H	2,15	WAT533
N181 H	1,95	WAT574
N181 Hδ1	2,05	WAT703
T195 Hγ	1,87	A228 O
M231 H	2,25	WAT501
F233 H	2,08	WAT585
N237 Hδ21	2,18	WAT673
S271 Hγ	1,77	D229 Oδ2
N272 Hδ22	1,98	E21 Oε1
L273 H	2,02	N272 Oδ1
H274 Hε2	1,86	WAT607
F275 H	2,11	WAT551
Q278 H	1,98	WAT963
G301 H	2,21	WAT545
Q304 H	2,08	E307 Oε2

Ergebnisse und Diskussion

Donor	Distanz (Å)	Akzeptor
Q304 Hε21	2,17	WAT580
Q304 Hε22	2,14	WAT658
Y305 H	2,03	WAT543
C306 H	2,08	WAT512
Ca-1	2,35	E21 Oε2
Ca-1	2,33	N120 Oδ1
Ca-1	2,40	N175 Oδ1
Ca-1	2,36	D229 Oδ1
Ca-1	2,48	WAT502
Ca-1	2,51	WAT524
Ca-1	2,35	WAT604
Ca-1	2,21	D232 Oδ2
Ca-2	2,26	L273 O
Ca-2	2,37	H274 Nδ1
Ca-2	2,30	WAT509
Ca-2	2,25	WAT615
Ca-2	2,25	WAT683
WAT501	2,74	D121 Oδ2
WAT501	3,18	WAT683
WAT502	2,84	N120 O
WAT502	2,93	WAT604
WAT505	2,75	Q304 Oε1
WAT505	2,84	WAT607
WAT509	2,78	D232 Oδ1
WAT511	2,89	WAT527
WAT512	2,69	C78 O
WAT512	2,83	WAT505
WAT520	2,85	E307 Oε2

Ergebnisse und Diskussion

Donor	Distanz (Å)	Akzeptor
WAT524	2,82	D229 Oδ2
WAT524	2,81	WAT511
WAT527	2,78	E37 Oε1
WAT533	3,25	WAT538
WAT535	2,74	N290 Oδ1
WAT535	2,80	WAT619
WAT538	2,76	I177 O
WAT538	3,16	M231 O
WAT542	2,80	WAT545
WAT543	3,43	WAT512
WAT545	3,02	K276 O
WAT545	3,11	T279 O
WAT549	2,85	F233 O
WAT549	2,87	K302 O
WAT551	3,03	D232 Oδ2
WAT551	2,77	WAT549
WAT552	2,88	WAT535
WAT552	2,85	WAT643
WAT574	2,70	N237 Oδ1
WAT574	2,74	WAT703
WAT580	2,93	Q77 Oε1
WAT580	2,89	WAT533
WAT585	2,79	D232 Oδ1
WAT604	2,69	D121 Oδ2
WAT607	2,69	WAT520
WAT613	2,79	WAT520
WAT613	2,85	WAT542
WAT614	2,84	C76 O

Ergebnisse und Diskussion

Donor	Distanz (Å)	Akzeptor
WAT615	2,73	WAT614
WAT615	3,09	WAT623
WAT619	2,69	E37 Oε1
WAT623	2,81	M231 O
WAT623	2,68	N272 Oδ1
WAT643	2,76	E37 Oε2
WAT658	3,26	WAT549
WAT658	2,75	WAT585
WAT671	2,68	F124 O
WAT671	2,65	WAT705
WAT673	2,81	H181 O
WAT673	2,75	N183 Oδ1
WAT683	3,18	D121 Oδ1
WAT683	2,83	C122 O
WAT703	2,65	C179 O
WAT703	2,78	WAT705
WAT705	2,86	K303 O
WAT705	2,66	WAT658
WAT963	2,77	E307 Oε1
WAT963	3,30	WAT542

Tab. 3.9: Auflistung der im zentralen Tunnel der DFPase bestehenden Wasserstoffbrücken sowie Calciumkoordinationen. Die angegebenen Abstände entsprechen den Abständen zwischen den Heteroatomen oder, wenn das Proton genannt ist, dem Abstand zwischen dem Proton und dem Heteroatom. Die Wasserstoffbrücke zwischen WAT552 und WAT535 ist kursiv dargestellt, da das Proton des WAT552 in der Kristallstruktur zwar nicht zu sehen ist, der Abstand (2,88 Å) und der Winkel (97,9°) jedoch auf eine Wasserstoffbrücke schliessen lassen.

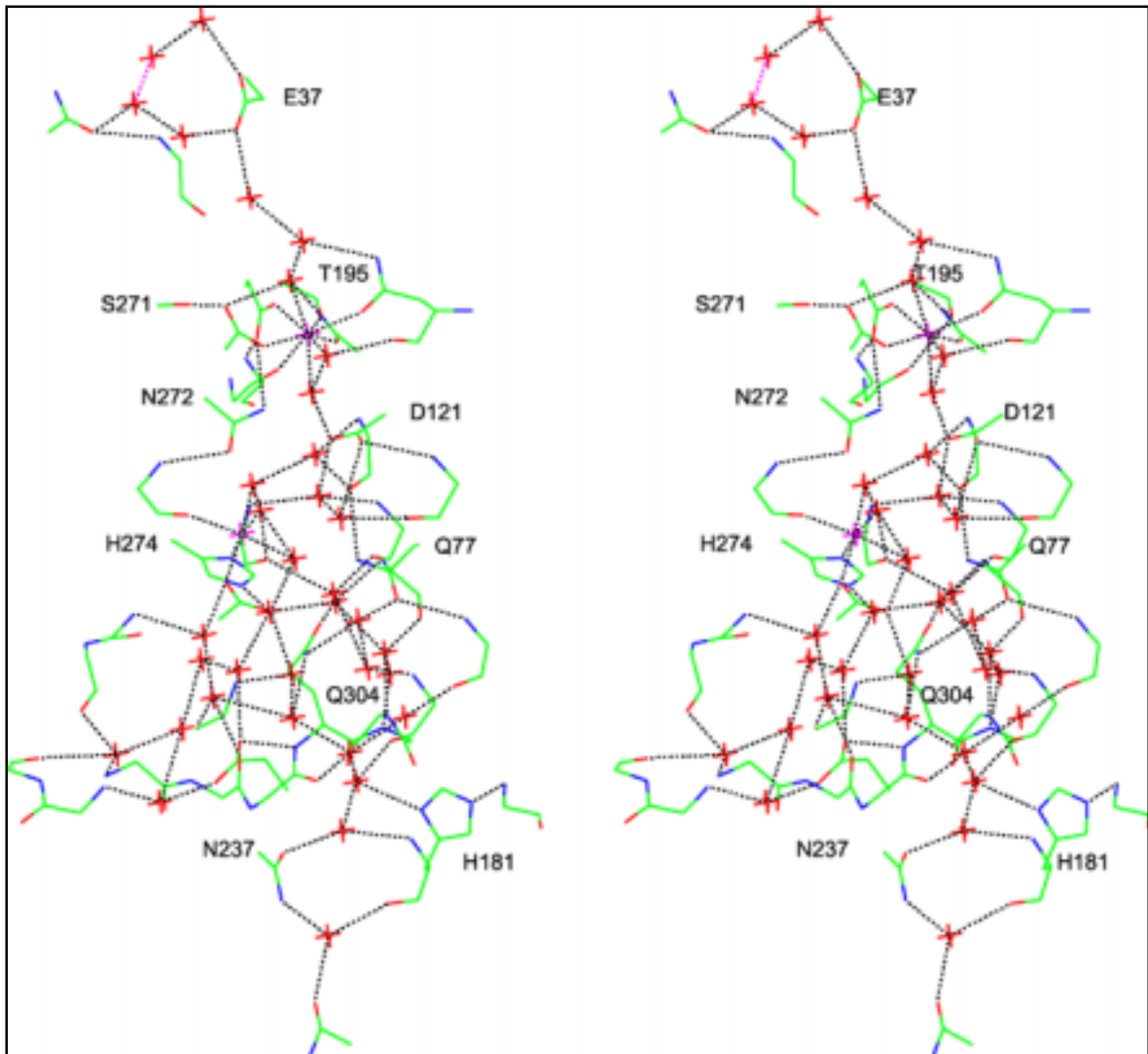


Abb. 3.13: Stereodarstellung des zentralen Tunnels der DFPase. Die im Tunnel befindlichen Wassermoleküle werden als rote Kreuze, die beiden Calciumatome als Kreuze in Magenta dargestellt. Die bei 0,85 Å Auflösung (Koepke et al., 2003; PDB ID Code 1PJX) sichtbaren Wasserstoffbrücken und Calciumkoordinationen sind als schwarze, gestrichelte Linien dargestellt. Die Wasserstoffbrücke zwischen WAT552 und WAT535 ist in Magenta gezeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm Insight (MSI, User Guide, 1997) erzeugt.

Zur Untersuchung der Rolle des im zentralen Tunnel der DFPase befindlichen Wasserstoffbrückennetzwerks wurde eine Reihe von Mutationen erzeugt, welche dieses

Ergebnisse und Diskussion

Netzwerk beeinflussen bzw. unterbrechen sollten (s. Tab. 3.10). Alle Mutanten wurden wie beschrieben hergestellt (s. Abschn. 2.1.3 und 2.3.11) und exprimiert (s. Abschn. 2.4.1). Ihre Positionen im zentralen Tunnel der DFPase sind der Abb. 3.13 zu entnehmen.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Hydrophobizität kcal/mol	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	1,30	2,1 ± 0,2
Q77F	0	0%	-2,27	4,3 ± 0,4
Q77Y	182	94%	-1,47	2,1 ± 0,3
Q77W	205	106%	-2,13	2,2 ± 0,3
Q304F	97	50%	-2,27	2,0 ± 0,1
Q304W	188	97%	-2,13	1,8 ± 0,3
Wildtyp	194	100%	1,91	2,1 ± 0,2
N272F	0	0%	-2,27	0,7 ± 0,3
Wildtyp	194	100%	3,81	2,1 ± 0,2
D121F	0	0%	-2,27	0,9 ± 0,3
Wildtyp	194	100%	1,91	2,1 ± 0,2
N237S	187	96%	1,24	1,8 ± 0,3

Tab. 3.10: Spezifische Aktivitäten und Calciumgehalte der Mutanten im zentralen Tunnel der DFPase. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind die Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden. Die angegebenen Hydrophobizitätswerte sind aus Roseman et al. (1988) entnommen.

3.2.6.1 Die Rolle von Gln77

Das Gln77 bildet eine Wasserstoffbrücke mit WAT120, welches ein Koordinationspartner des Ca-2 ist (s. Abb. 3.13 & Tab. 3.9). Zur Unterbrechung des Wasserstoffbrückennetzwerks wurde zunächst das Gln77 durch Phenylalanin substituiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Q77F-Mutante wies bei den für den Wildtyp optimierten Bedingungen eine sehr schlechte Expressionsrate auf. Die Erniedrigung der Expressionstemperatur führte zur weiteren Abnahme der exprimierten Proteinmenge. Zur Erlangung einer zufriedenstellenden Proteinausbeute mußten somit die Zellen aus mehreren Litern Bakterienkultur gleichzeitig aufgeschlossen und aufgearbeitet werden. Trotzdem war die gewonnene Proteinmenge nicht ausreichend, um damit die Isolierungsprozedur vollständig durchzuführen. Deshalb wurde das nach dem Zellaufschluß gewonnene Lysat über die erste Metallchelat-Affinitätssäule aufgereinigt und noch die Oligohistidin-Domäne tragend aufkonzentriert. Zur Überprüfung der Tertiärstruktur der Q77F-Mutante wurden eindimensionale Protonenspektren mittels NMR aufgenommen und mit dem Wildtyp verglichen (s. Abschn. 2.7). Die Spektren ergaben, dass die Proteinlösung aus aggregiertem, entfaltetem Protein bestand. Auch die Kinetikmessungen dieser Mutante wiesen einen kompletten Aktivitätsverlust auf (s. Tab. 3.10). Der ungewöhnlich hohe Calciumgehalt der Q77F-Mutante (s. Tab. 3.10) könnte einerseits auf den Verlust der Tertiärstruktur des Proteins zurückzuführen sein, welcher u.U. die unspezifische Bindung von Ca-Atomen an mehreren Stellen des Proteins erlaubt, andererseits könnte die noch vorhandene Oligohistidin-Domäne der Q77F-Mutante Ca-Atome unspezifisch komplexieren.

Im Gegensatz zur Q77F-Mutante bewirkte die Substitution des Glutamins gegen Tryptophan und Tyrosin an dieser Position keine nennenswerte Aktivitätsänderung (s. Tab. 3.10). Die Expression dieser beiden Mutanten erfolgte entsprechend den Bedingungen für den Wildtyp, und die Calciumgehalte entsprachen ebenfalls denen des Wildtyp-Enzyms. Die Aufnahme von eindimensionalen ^1H -NMR-Spektren der Mutanten Q77Y und Q77W zeigte, dass ihre Faltung mit der Struktur des Wildtyp-Enzyms vergleichbar war.

Die Kinetik-, TXRF- und NMR-Messungen der Q77F-Mutante deuten darauf hin, dass die Einführung einer großen, vollständig hydrophoben Seitenkette an der Position 77, welche überhaupt keine Wasserstoffbrücke ausbilden kann, die korrekte Faltung der Tertiärstruktur der DFPase verhindert. Da die Mutanten Q77Y und Q77W, welche die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung besitzen, weder einen Struktur- noch einen Aktivitätsverlust aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass im zentralen Tunnel

der DFPase ein Wasserstoffbrückennetzwerk besteht, welches für die enzymatische Aktivität und die strukturelle Integrität des Proteins eine Rolle spielt.

3.2.6.2 Die Rolle von Gln304

Der Rest Gln304 ist ebenfalls über eine Wasserstoffbrücke mit dem WAT120 verbunden (s. Abb. 3.13 & Tab. 3.9) und könnte folglich auch an dem Wasserstoffbrückennetzwerk im zentralen Tunnel der DFPase beteiligt sein. Um dies zu untersuchen, wurden die Mutanten Q304F und Q304W erzeugt. Beide Mutanten wurden nach den für das Wildtyp-Enzym optimierten Bedingungen exprimiert und aufgereinigt. Wie sich aus den Aktivitätsmessungen dieser Mutanten ergab, führte die Substitution des Glutamins gegen Phenylalanin an der Position 304 zu einem Aktivitätsverlust von 50%, während die Q304W-Mutante kaum eine Aktivitätsänderung verglichen mit dem Wildtyp aufwies (s. Tab. 3.10). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass an der Position 304 ein großer, vollständig hydrophober Rest zwar einen hemmenden Effekt auf die katalytische Aktivität der DFPase haben kann, aber zu keiner Missfaltung des Proteins führt. Dies wird auch durch den dem Wildtyp entsprechenden Calciumgehalt der Q304F-Mutante unterstützt (s. Tab. 3.10). Das Phenylalanin an der Position 304 unterbricht wahrscheinlich die Wasserstoffbrücke mit dem WAT120 und beeinträchtigt dadurch das Wasserstoffbrückennetzwerk aufgrund seiner Hydrophobizität, während das Tryptophan, mit seiner Indolgruppe, an derselben Position die Wasserstoffbrückenbildung weiterhin ermöglicht.

3.2.6.3 Die Rolle von Asn272 und Asp121

Zur weiteren Untersuchung der Rolle des Wasserstoffbrückennetzwerks im Tunnel der DFPase wurden die Reste Asn272 und Asp121 mutiert. Beide Aminosäuren liegen einander gegenüber zwischen den beiden Ca-Atomen (s. Abb. 3.13). Wie aus der Kristallstruktur des Wildtyps ersichtlich, koordiniert das Asn272 das WAT44, welches ein Ca-1 Ligand ist und gleichzeitig das WAT283, welches ein Ca-2 Ligand ist (s. Abb. 3.13).

Ergebnisse und Diskussion

Um die Rolle der beiden Reste an dem Wasserstoffbrückennetzwerk, über welches das Ca-1 vermutlich mit dem Ca-2 wechselwirkt, zu untersuchen, wurden die Mutanten N272F und D121F erzeugt. In beiden Fällen wurde somit die Unterbrechung des Wasserstoffbrückennetzwerks durch die Einführung einer großen, hydrophoben Seitenkette erzielt.

Die Expression und Aufreinigung der Mutanten D121F und N272F folgte nach den für den Wildtyp optimierten Bedingungen (s. Abschn. 2.1.3, 2.3.11 und 2.4.1). Die Expressionsrate der beiden Mutanten war um ca. 30% niedriger als die des Wildtyps; trotzdem konnte aus einem Liter Bakterienkultur ausreichend Protein gewonnen werden, um die weitere Analytik durchzuführen.

Wie aus der Tab. 3.10 entnommen werden kann, wiesen beide Mutanten einen totalen Aktivitätsverlust auf und enthielten jeweils nur ein Ca-Ion pro Proteinmolekül. Zur Überprüfung des Zustands der Tertiärstruktur der Mutanten wurden eindimensionale ^1H -NMR-Spektren aufgenommen, wodurch gezeigt werden konnte, dass in beiden Fällen die Gesamtstruktur des Proteins intakt geblieben war. Um ganz ausschließen zu können, dass die Einführung der Mutationen keine wesentlichen strukturellen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym hervorgerufen hat, wurden $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY Experimente herangezogen, welche gezeigt haben, dass die Faltung sowohl der N272F- als auch der D121F-Mutante der Struktur der Wildtyp-DFPase entsprach. Allerdings war bei den NMR-Messungen der N272F-Mutante auffällig, dass die ^{15}N -markierte Proteinprobe sehr instabil war und schon zwei Wochen nach der Präparation aggregierte. Die Präparation der ^{15}N -markierten Proteinproben der Mutanten N272F und D121F erfolgte analog zur Präparation des Wildtyp-Enzyms (s. Abschn. 2.4.2 und 2.4.3.1).

Der komplette Aktivitätsverlust, der Verlust jeweils eines Ca-Ions und die gleichzeitige Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur deuten bei den Mutanten D121F und N272F darauf hin, dass die Einführung des hydrophoben Phenylrings an den Positionen 121 und 272 jeweils einen direkten Einfluss auf die enzymatische Reaktion hat. Die Tatsache, dass einerseits die Faltung der beiden Mutanten durch die Einführung der Mutation nicht

beeinträchtigt wird, aber andererseits die enzymatische Aktivität und ein Ca-Ion verlorengehen, erlaubt die Annahme, dass es sich bei dem fehlenden Ca-Atom jeweils um das Ca-1 handelt.

Aus den Kinetik-, TXRF- und NMR-Messungen der Mutanten D121F und N272F ergab sich somit, dass der jeweils eingeführte Phenylring die Struktur des Proteins zwar nicht aufgesprengt hat, aber die Koordination des einen Ca-Ions - vermutlich des für die Enzymaktivität verantwortlichen Ca-1 - derart beeinträchtigt hat, dass es zum Verlust dieses Ions gekommen ist. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Substitution der beiden polaren Glutaminreste an den Positionen 121 und 272 jeweils durch Phenylalanin die Koordination des Ca-1 beeinträchtigt hat. Da sowohl der Rest 121 als auch der Rest 272 kein direkter Koordinationspartner der beiden Ca-Ionen ist, kann dieser Effekt nur über das Wasserstoffbrückennetzwerk im Tunnel der DFPase zustande gekommen sein.

Die Rolle von Resten, welche mit den direkten Metallkoordinationspartnern wechselwirken, wurde in den letzten Jahren genauer analysiert und ihre Wichtigkeit hervorgehoben. Untersuchungen an der humanen Carboanhydrase II (Christianson & Alexander, 1989; Lesburg & Christianson, 1995; Kiefer et al., 1995; Huang et al., 1996; Cox et al., 2000; McCall et al., 2000; DiTusa et al., 2001), an den Metallophosphatasen Calcineurin (Mertz et al., 1997) und humanem Serumtransferrin (He et al., 1998) sowie an der EcoRV Restriktionsendonuklease (Vipond et al., 1996) haben gezeigt, dass die indirekten Liganden eine nicht unbedeutende Rolle an der Ausrichtung der direkten Koordinationspartner in die richtige Position spielen, was einerseits zur Erhöhung der Affinität für die Metallbindung führen und andererseits den pK-Wert sowie die Reaktivität der direkt koordinierenden katalytischen Wassermoleküle regulieren kann (Dudev et al., 2003). Auf ähnliche Weise wird offensichtlich in der DFPase die Ca-1 Koordination durch die N272F-Mutation indirekt über das WAT44 beeinträchtigt, was zur Destabilisierung der Ca-1 Bindung führt und dementsprechend den Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms als Folge hat. Die Positionierung von Metallen in Proteinmolekülen durch indirekte Wasserstoffbrücken zu den Metallen über Wassermoleküle wurde für mehrere Proteine, u. a. die 3,4-Dihydroxy-butanon-4-Phosphat-Synthase aus *Magnaporthe grisea* (Liao et al., 2002), berichtet.

3.2.6.4 Die Rolle von Asn237

Schließlich wurde noch der Rest Asn237, welcher sich am Ende des zentralen Tunnels der DFPase befindet (s. Abb. 3.13), durch Serin ausgetauscht. Serin ist, wie Asparagin, ebenfalls polar und sollte deshalb weder einen nennenswerten Effekt auf die Strukturstabilität noch auf die enzymatische Aktivität des Proteins haben. Die Kinetik- und TXRF-Messungen bestätigten diese Annahme (s. Tab. 3.10), da die N237S-Mutante eine ähnliche spezifische Aktivität und einen vergleichbaren Calciumgehalt wie der Wildtyp aufwies. Dagegen war die H181N-Mutante des benachbarten His181-Restes um 23% inaktiver als der Wildtyp (s. Abschn. 3.4.1), was vermutlich nur durch eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum durch den zentralen Tunnel der DFPase hindurch zu erklären ist. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut, dass das im Tunnel der DFPase befindliche Wasserstoffbrückennetzwerk einen Einfluß auf die katalytische Funktion des Enzyms zu haben scheint.

3.2.7 Erzeugung von Doppelmutanten zur Erhöhung der DFPase-Aktivität gegenüber DFP

Das Ziel der DFPase Produktion im großtechnischen Maßstab ist der Einsatz des Enzyms zur Dekontamination von mit Organophosphaten kontaminierten Flächen. Da die Herstellung des Enzyms aufwendig und kostspielig ist, wird eine höchstmögliche Hydrolyserate des Enzyms angestrebt. Zu diesem Zwecke wurden - basierend auf den aktivsten DFPase-Mutanten - Doppelmutanten hergestellt. Somit wurden die Mutationen H224N und S271A, S271A und F173L sowie S271A und D232S zu jeweils einer Doppelmutante kombiniert.

Zur Herstellung der Doppelmutanten wurde ebenfalls das "Site-Directed Mutagenesis" Kit (Stratagene) verwendet. Als Templat für die Amplifikationsreaktion wurde jedoch nicht der Wildtyp, sondern jeweils die bereits die erste Mutation tragende DNA eingesetzt. Die komplementären Oligonukleotide, welche der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden, trugen die zweite Mutation. Die restliche Prozedur erfolgte wie beschrieben (s. Abschn.

2.3.10). Zur Analyse der so entstandenen, mutierten DNA erfolgte eine Sequenzierung über jenen Bereich, in welchem beide Mutationen detektiert werden konnten, sowohl im Haupt- als auch im Nebenstrang der Plasmid-DNA (s. Abschn. 2.3.11). Die spezifische Aktivität der S271A/F173L-Doppelmutante betrug 95% der des Wildtyps, was bedeutet, dass sich die Beiträge der einzelnen Mutanten zur Enzymaktivität bei der Doppelmutante in etwa ausgeglichen haben (s. Tab. 3.11). Bei der H224N/S271A-Mutante hingegen wäre, verglichen mit dem Wildtyp, eine spezifische Aktivität von ungefähr 150% zu erwarten gewesen. Allerdings betrug die gemessene spezifische Aktivität dieser Doppelmutante nur 105% der des Wildtyps. Analog wäre bei der S271A/D232S-Mutante eine um 37% höhere Aktivität als beim Wildtyp zu erwarten gewesen, wohingegen die Aktivitätsmessungen eine um 19% geringere spezifische Aktivität verglichen mit dem Wildtyp aufwies.

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	2,1 ± 0,2
H224N (Hartleib, 2000)	219	113%	2,22 ± 0,35
S271A (Scharff, 2000)	260	134%	1,8 ± 0,2
F173L	143	74%	1,9 ± 0,3
D232S	200	103%	2,0 ± 0,3
H224N/S271A	204	105%	2,0 ± 0,1
S271A/F173L	185	95%	2,0 ± 0,1
S271A/D232S	158	81%	1,9 ± 0,2

Tab. 3.11: Spezifische Aktivitäten und Calciumgehalte der aktiveren DFPase-Mutanten sowie verschiedener aus deren Kombination entstandenen Doppelmutanten. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind die Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden.

Wie aus der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten dieser Doppelmutanten deutlich wird, bringt die Kombination von zwei im Vergleich zum Wildtyp aktiveren Mutanten in

Form einer Doppelmutante keine additive Erhöhung der Aktivität der DFPase. Vielmehr führt diese Vorgehensweise im Fall der S271A/D232S-Mutante sogar zu einer deutlichen Erniedrigung der DFPase-Aktivität. Dieses Ergebnis zeigt, dass zwei gleichzeitig eingeführte Mutationen, welche jede für sich eine Erhöhung der Enzymaktivität bewirkt, sich gegenseitig negativ beeinflussen können, auch wenn die mutierten Reste keinen direkten Kontakt miteinander haben.

3.3 Suche nach Inhibitoren der DFPase

Die DFPase aus *L. pealei* wird durch verschiedene Mono- und Dialkylphosphate inhibiert, wobei monosubstituierte Phosphate mit einem verzweigten oder großen Alkylsubstituenten (wie einer Isopropyl- oder Phenylgruppe) die besten Inhibitoren sind (Gay & Hoskin, 1979). Ein ähnliches Verhalten konnte auch für die DFPase aus *L. vulgaris* bestätigt werden. So führte die Inkubation der DFPase aus *L. vulgaris* mit einem 10-20fachen Überschuss Diphenylphosphat bzw. einem mehr als 20fachen Überschuss Isopropylphosphat (Gemisch aus Mono- (40%) und Diester (60%)) gegenüber DFP zu einer 50%igen Inhibition der DFPase, was einer Inhibitionskonstante K_i im Bereich von $10^{-2} - 10^{-1}$ M entspricht. Dagegen inhibieren Alkylphosphate mit kleineren Alkylsubstituenten, wie z. B. Ethylphosphat, die DFPase gar nicht (Hartleib, 2000).

Die Substratbindungsstelle der Phosphotriesterase aus *P. diminuta* (PTE) wird vor allem von hydrophoben Aminosäuren gebildet, so dass die Substratbindung hauptsächlich von hydrophoben und sehr wenigen elektrostatischen Wechselwirkungen bestimmt wird. Auch bei der DFPase aus *L. vulgaris* beruht die Substratbindung offensichtlich auf hauptsächlich hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylsubstituenten des Substrats und dem Enzym (s. Abschn. 3.4.2 und 3.2.4). Wie sich aus kristallographischen Analysen der PTE ergeben hat, wird die Abgangsgruppe des Substrats in einer hydrophoben Tasche dieses Enzyms positioniert, welche aus Trp131, Phe132, Leu271, Phe306 und Tyr309 besteht (Vanhooke et al., 1996). Paraoxon-Analoga, in denen eine oder beide Ethoxy-Gruppen entfernt worden sind, wurden von der PTE hingegen nicht hydrolysiert (Donarski

et al., 1989). Die PTE konnte daher durch eine Reihe von Alkynylphosphatestern inaktiviert werden. Die mechanistische Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Entstehung eines reaktiven Keten-Intermediates, welches während der enzymatisch katalysierten Hydrolyse dieser Ester auftrat (Banzon et al. 1995a, 1995b).

Die PTE wurde mit den Substratanaloga Diethyl-4-Methylbenzylphosphonat und Diisopropylmethylphosphonat (DIMP) kokristallisiert. Gemäß der Kristalldaten der PTE mit dem Diethyl-4-Methylbenzylphosphonat sind in der Bindungstasche des Enzyms keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und dem Inhibitor zu beobachten (Vanhooke et al., 1996). Der Inhibitor Diisopropylmethylphosphonat wurde zur Nachahmung der Bindung des Substrats Sarin an dem Enzym eingesetzt. Der einzige Unterschied zwischen Sarin und DIMP ist der Austausch der Fluoridabgangsgruppe des Nervengases durch eine Isopropylgruppe. Die Kokristallisation der PTE mit dem DIMP zeigte, wie im Fall des Diethyl-4-Methylbenzylphosphonats, dass die Inhibitor-Bindungstasche keine direkten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Ligand und dem Protein aufweist. Nur eine mögliche Wasserstoffbrückenbildung zwischen dem Nε1 des Trp131 und dem Phosphorylsauerstoffatom des DIMP wurde beobachtet. Interessanterweise waren beide Phosphonatsubstituenten, die Methyl- und Methylbenzylgruppen, trotz unterschiedlicher relativer Größe in der großen Bindungstasche der PTE positioniert (Benning et al., 2000).

Aufgrund der bestehenden Ähnlichkeiten in der Substratbindung zwischen der PTE und der DFPase aus *L. vulgaris* wurden an der DFPase Inhibitionsexperimente mit den Substratanaloga der PTE durchgeführt. Die Inkubation der DFPase mit einem 5-10fachen Überschuss an Diethyl-4-Methylbenzylphosphonat bzw. DIMP gegenüber DFP führte zu einer 50-70%igen Inhibition der DFPase. Aufgrund der hohen Inhibitorkonzentrationen, die für eine Inhibition der DFPase erforderlich sind, wurde jedoch auf weitergehende kinetische Untersuchungen verzichtet, da anzunehmen ist, dass diese Inhibition zumindest teilweise auf unspezifischen Wechselwirkungen beruht.

Trotzdem wurde versucht, Protein-Inhibitor-Komplexe zu kristallisieren. Zu diesem Zweck wurde sowohl die DFPase mit unterschiedlichen Mengen Diethyl-4-

Ergebnisse und Diskussion

Methylbenzylphosphonat kokristallisiert, als auch bereits gewachsene Wildtyp-Kristalle mit einer Inhibitorlösung getränkt ("Soaking"). In beiden Fällen war die für die Kristallisation verwendete Inhibitorkonzentration auch im Kryopuffer enthalten. Die Zugabe eines 100fachen Überschusses an Diethyl-4-Methylbenzylphosphonat zu den bereits gewachsenen Wildtyp-Kristallen führte zu deren baldiger Auflösung, was die Aufnahme eines Röntgendatensatzes unmöglich machte. Deshalb durfte bei den Soaking-Experimenten höchstens ein 50facher Überschuss an Inhibitor zugegeben werden, so dass die Kristalle intakt blieben.

Die so erhaltenen Kristalle wurden am DESY, Hamburg, an der EMBL Beamline BW7 bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Die Strukturverfeinerung der aufgenommenen Daten ergab jedoch, dass der Inhibitor scheinbar nicht an das Enzym gebunden wurde. Dies könnte einerseits daran gelegen haben, dass die Seitenketten dieses Analogons zu groß sind, um in den hydrophoben Bindungstaschen der DFPase optimal eingelagert zu werden. Andererseits könnte das Phe314 die Positionierung und Ausrichtung des Inhibitors in dem Proteinmolekül stören, da, wie sich aus der Betrachtung symmetrieäquivalenter DFPase-Moleküle in der Kristallstruktur ergab, die Phe314-Seitenkette eines Proteinmoleküls über hydrophobe Wechselwirkungen jeweils mit der Trp244-Seitenkette im aktiven Zentrum des benachbarten Moleküls interagiert (Scharff, 2000).

Mutante	spez. Aktivität [U/mg]	Aktivität bezogen auf den WT [%]	Calciumgehalt [TXRF]
Wildtyp	194	100%	2,1 ± 0,2
F314A	199	103%	2,2 ± 0,2

Tab. 3.12: Spezifische Aktivität und Calciumgehalt der F314A-Mutante. Die hier aufgelisteten spezifischen Aktivitäten (in U/mg) sind die Mittelwerte aus pH-Stat- und Fluoridmessungen (s. Tab. 3.1). Die TXRF-Werte sind jeweils viermal an Proteinproben aus fünf unterschiedlichen Präparationen bestimmt worden.

Um die letztere Möglichkeit ausschließen zu können, wurde das Phe314 durch ein Alanin ersetzt, so dass die Inhibitorbindung im aktiven Zentrum der DFPase nicht durch die relativ große Phe314-Seitenkette des Nachbarproteins sterisch beeinträchtigt werden konnte. Die F314A-Mutante wurde nach den für den Wildtyp optimierten Bedingungen exprimiert und aufgereinigt (s. Abschn. 2.1.3, 2.3.11 und 2.4.1) und wies nahezu die gleiche spezifische Aktivität und denselben Calciumgehalt wie das Wildtyp-Enzym auf (s. Tab. 3.12). Kristallisationsansätze der F314A-Mutante mit dem Diethyl-4-Methylbenzylphosphonat wurden analog zum Wildtyp durchgeführt und ebenfalls am DESY, Hamburg, an der EMBL Beamline BW7 gemessen. Die von Dr. Jürgen Köpke durchgeführten Strukturrechnungen und –verfeinerungen zeigten, wie im Fall des Wildtyps, dass der Inhibitor nicht an das Enzym gebunden hat, weshalb ein sterischer Einfluss der Phe314-Seitenkette auf die Inhibitorbindung ausgeschlossen werden kann. Die Datenaufnahme und –rechnung der Wildtyp-DFPase bzw. der F314A-Mutante mit dem DIMP stehen noch aus und werden im Sommer/Herbst 2003 von Dr. Günter Fritsch und Mitarbeitern freundlicherweise am DESY, Hamburg, durchgeführt. Da die DFPase eine ziemlich hohe Affinität für Sarin aufweist, wäre zu erwarten, dass auch das DIMP, hauptsächlich aufgrund seiner kleineren Seitenketten im Vergleich zum Diethyl-4-Methylbenzylphosphonat, an das Enzym binden und es somit inhibieren kann.

3.4 Kinetische Messungen

Die kinetischen Messungen, welche mit verschiedenen DFPase-Mutanten durchgeführt wurden, dienten zur Untersuchung der Rolle bestimmter Aminosäurereste und deren Effekt auf den Reaktionsmechanismus und die Katalyse. Außerdem wurden zusätzlich die kinetischen Parameter der durch das Wildtyp-Enzym katalysierten Reaktionen mit anderen Substraten wie Sarin, Soman und Tabun bestimmt. Diese Messungen wurden in der Vergangenheit von Dr. Wolfgang Schulz mit dem nativen, aus den Tintenfischkopfganglien isolierten Enzym durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die katalytischen Eigenschaften der rekombinanten DFPase mit diesen Substraten untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Auswertung der kinetischen Messungen wurde die Theorie der Michaelis-Menten-Kinetik verwendet, da aufgrund der Linearität der "first-order plots" davon ausgegangen werden konnte, dass der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes einer Reaktion 1. Ordnung entspricht, und dass im beobachteten Konzentrationsbereich keine Produkthemmung auftritt (s. Abschn. 2.5.5).

Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{\max} erfolgte durch die Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit V_0 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration S_0 . Dabei wurden nach Bestimmung der exakten DFP Konzentration der ethanolischen DFP-Stammlösung pro Meßreihe acht Aktivitätsmessungen mit Substratkonzentrationen zwischen 0,1 – 5 mM durchgeführt, wobei die in jeder Reaktion eingesetzte Menge der frischen und homogenen Enzymlösung immer $3,43 \times 10^{-12}$ mol DFPase pro Test (= 0,024U) betrug.

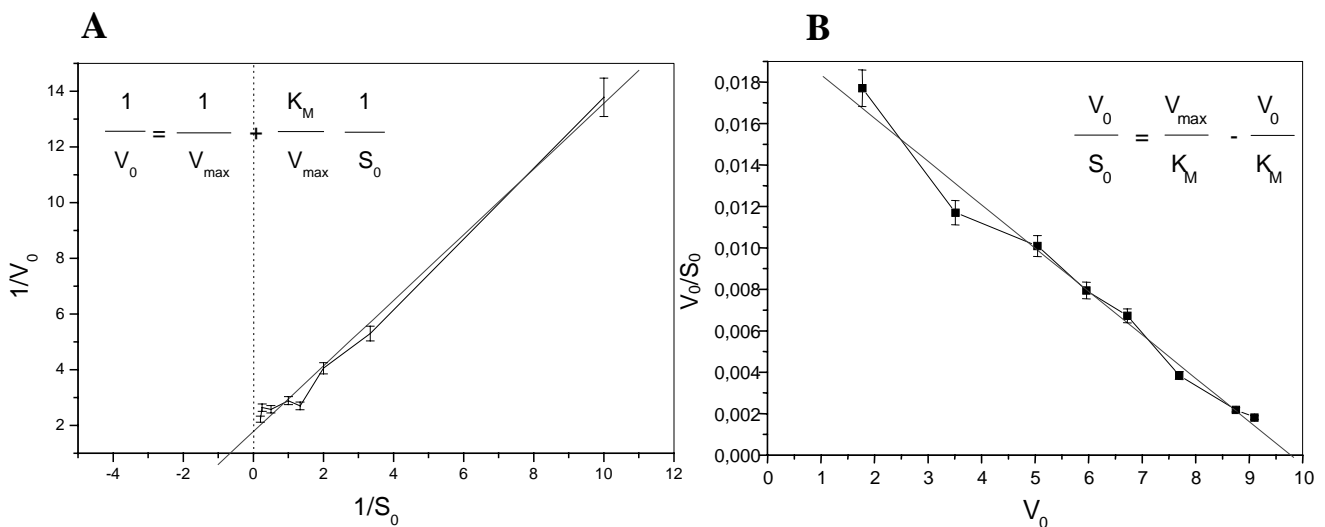


Abb. 3.14: Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{\max} ; exemplarisch dargestellt ist eine Meßreihe bei 20 °C und pH 7,5. **A:** Lineweaver-Burk-Diagramm, **B:** Eadie-Hofstee-Diagramm.

Nach der Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit V_0 mittels der "first order plots" erfolgte die Auftragung der Meßdaten nach Lineweaver-Burk bzw. nach Eadie-Hofstee (s. Abb. 3.14). Diese linearisierten Darstellungen ermöglichen eine exaktere Bestimmung von K_M und V_{\max} ; allerdings sind auch diese Methoden fehlerbehaftet. Im Lineweaver-Burk-Diagramm drängen sich die Meßpunkte im Sättigungsbereich, während der schwerer

zugängliche niedere Substratbereich stark gedehnt und die hier liegenden Meßpunkte scheinbar überbewertet werden. Entsprechend nehmen auch die Fehlergrenzen in dieser Richtung stark zu. Bei der Darstellung nach Eadie-Hofstee geht eine Variable, die Reaktionsgeschwindigkeit V_0 in den Maßstab für beide Achsen ein. Das macht sich ebenfalls in einer relativen Neigung der Fehlergrenzen bemerkbar. Zur Fehlerminimierung wurden für die hier durchgeführten Messungen beide Darstellungen verwendet, wobei die so ermittelten K_M - bzw. V_{\max} -Werte im allgemeinen gut übereinstimmen.

3.4.1 Kinetische Messungen an DFPase-Mutanten mit DFP als Substrat

Kinetische Messungen mit DFP als Substrat wurden mit den Mutanten E37Q, S271A, H181N, H224N, H274N und H287N (s. Tab. 3.13 & Abb. 3.15) durchgeführt. Hartleib et al. postulierten, dass der His287-Rest essentiell für die Katalyse ist, da die spezifische Aktivität der H287N-Mutante nur 4% der spezifischen Aktivität des Wildtyps beträgt (Hartleib & Rüterjans, 2001). Gemäß dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus wird zunächst das His287 durch die Substratbindung reorientiert und aktiviert dabei ein Wassermolekül. Das aktivierte Wassermolekül greift anschließend das Phosphoratom des DFP nukleophil an; hierbei wird das His287 doppelt protoniert. Nach der Hydrolyse des DFP und der Freisetzung der Reaktionsprodukte reorientiert sich das His287 zurück und der ursprüngliche Zustand des aktiven Zentrums wird wieder hergestellt (Scharff et al., 2001a).

Die Carboxylatgruppe des Glu37 stabilisiert vermutlich die während der Katalyse reorientierte, positiv geladene His287-Seitenkette. Eine ähnliche Stabilisierungsfunktion für Glutamat wurde auch beim δ -II Krystallin aus Ente und bei der humanen Arginosuccinat-Lyase beobachtet (Chakraborty et al., 1999). Dieser Stabilisierungseffekt existiert hingegen bei der E37Q-Mutante nicht, da das Glutamin nicht als Protonenakzeptor fungieren kann. Deshalb nimmt offensichtlich die spezifische Aktivität dieser DFPase-Mutante um 50% ab. Die Mutante S271A weist wiederum eine um 30% höhere spezifische Aktivität auf, was darauf hindeutet, dass der Ser271-Rest nicht an der Katalyse beteiligt ist (Scharff et al., 2001a). Die H181N-Mutante ist etwa einviertel inaktiver als der Wildtyp,

was eventuell auf einer Änderung der Proteinstruktur bzw. –stabilität infolge der Mutation zurückzuführen ist. Die H224N- und H274N-Mutanten weisen um 5% bzw. 13% höhere Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp auf (Hartleib & Rüterjans, 2001).

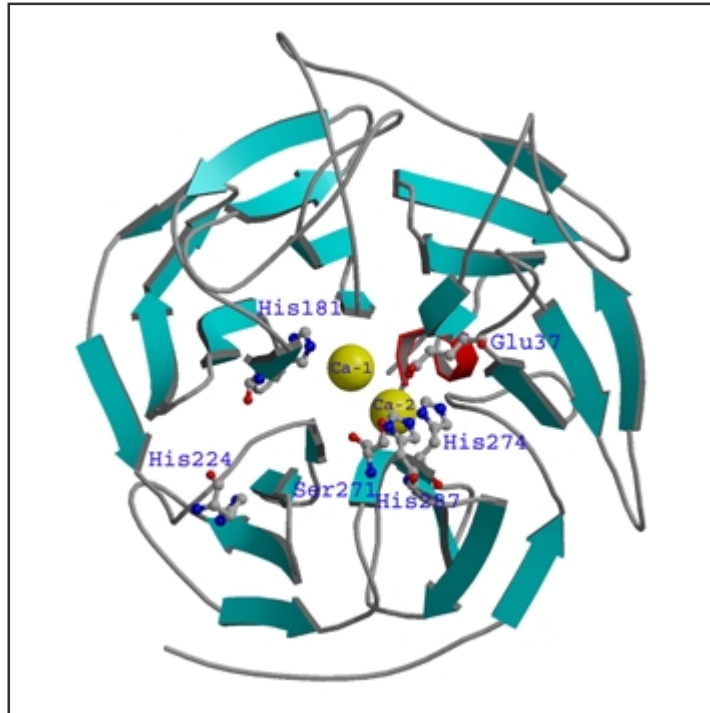


Abb. 3.15: Graphische Darstellung der Positionen der DFPase-Mutationen, welche kinetisch untersucht wurden. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erzeugt (Koradi et al., 1996).

Bei Standardbedingungen (25 °C, pH 7,5, 10 mM NaCl) beträgt der K_M -Wert der Wildtyp-DFPase 0,54 mM, $V_{\max} = 0,75 \text{ mol/l} \cdot \text{min} \cdot 10^5$ und $k_{\text{cat}} = 109 \text{ s}^{-1}$ (s. Tab. 3.13). Unter den gleichen Bedingungen wies die E37Q-Mutante einen vierfach niedrigeren K_M -Wert und eine um ca. 25% geringere Katalyserate auf. Dadurch, dass die Kristallstruktur der E37Q-Mutante keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigte (Scharff, 2000), kann die Abnahme von K_M und k_{cat} in dieser Mutante nur durch eine Veränderung der Elektrostatik im aktiven Zentrum begründet werden. Durch die Einführung der E37Q-Mutation wird die im Übergangszustand reorientierte, doppelt protonierte His287-Seitenkette vermindert stabilisiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die K_M - und k_{cat} -Werte der S271A-Mutante sind fast doppelt so hoch wie die Werte der Wildtyp-DFPase, was auf eine weniger feste Bindung und auf eine doppelt so schnelle Umsetzung des Substrats hindeutet. Da die Kristallstruktur der S271A-Mutante, mit Ausnahme des ausgetauschten Aminosäurerests, keine Unterschiede zum Wildtyp aufweist (Scharff, 2000), ist offensichtlich der hydrophobe Charakter der Methylgruppe des Alanins für die Umsatzsteigerung dieser Mutante verantwortlich (s. auch Abschn. 3.2.3).

Mutante	Spez. Aktivität		K_M [mM]	V_{max} [mol/l*min*10 ⁵]	k_{cat} [1/s]
	[U/mg]	[%]			
WT	208 ± 13	100	0,54 ± 0,1	0,75 ± 0,2	109
E37Q	103 ± 18	49,5	0,14 ± 0,07	0,55 ± 0,1	80
S271A	242 ± 5	116	1,06 ± 0,12	1,38 ± 0,2	201
H181N	161 ± 20	77,4	0,48 ± 0,08	0,75 ± 0,1	109
H224N	219 ± 20	105	0,57 ± 0,17	1,33 ± 0,2	195
H274N	236 ± 8	113	0,58 ± 0,08	1,13 ± 0,2	166
H287N	14 ± 2	6,7	0,03 ± 0,005	0,09 ± 0,005	14

Tabelle 3.13: Spezifische Aktivitäten, K_M -, V_{max} - und k_{cat} -Werte verschiedener DFPase-Mutanten. Alle Messungen zur Bestimmung der spezifischen Aktivität sowie der anderen kinetischen Parameter wurden mit der pH-Stat-Apparatur bei Standardbedingungen (25 °C, pH 7,5, 10 mM NaCl) durchgeführt. Alle dargestellten Werte wurden mehrfach an Proteinproben aus mindestens 3 unterschiedlichen Präparationen bestimmt.

Die kinetischen Parameter der H181N-Mutante sind trotz deutlicher Abnahme der spezifischen Aktivität nahezu identisch mit denen des Wildtyps. Dies lässt darauf schliessen, dass diese Mutation keinen nennenswerten Effekt auf das aktive Zentrum oder auf die Katalyse hat. Im Gegensatz hierzu sind die k_{cat} -Werte der H224N- und H274N-Mutanten um 80% bzw. 50% höher als der k_{cat} -Wert des Wildtyps, was wiederum auf eine höhere Umsatzrate hindeutet. Die durch die H224N-Mutation bedingte höhere Katalyserate kann jedoch nicht auf strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum zurückgeführt werden, da der H224-Rest etwa 14 Å vom His287, welches für die Katalyse essentiell zu sein scheint, entfernt ist. Das gilt auch für His274, ein Ligand des Ca-2 Ions, der zu dem an

der Katalyse beteiligten Ca-1 Ion einen Abstand von 10 Å aufweist. Ein direkter Effekt auf die Katalyse ist somit für beide Mutanten ausgeschlossen. Da die H274N-Mutante stabil ist und zwei Ca-Ionen enthält (Hartleib, 2000), kann der steigernde Effekt auf die Katalyse nur indirekt über das Wasserstoffbrückennetzwerk in dem mit Wassermolekülen gefüllten Tunnel des Proteins erklärt werden. Wie in dieser Arbeit zuvor bereits gezeigt worden ist, haben verschiedene Komponenten in diesem Tunnel einen bemerkenswerten Einfluss auf die Enzymaktivität (s. Abschn. 3.2.6).

Die Tatsache, dass der His287-Rest essentiell für die Katalyse ist, wird auch durch den um 88% niedrigeren k_{cat} -Wert der H28N-Mutante unterstützt. Das Substrat wird anscheinend zwar von der Mutante gebunden, kann aber nur sehr langsam umgesetzt werden. Der N287-Rest kann hingegen nicht protoniert werden und somit auch nicht das Wassermolekül aktivieren, welches dann nukleophil das Phosphoratom des DFP angreifen würde.

Diese kinetischen Messungen unterstützen somit die Annahme, dass der Glu37-Rest einen direkten Effekt auf die Katalyse hat, möglicherweise durch Stabilisierung des doppelt protonierten Übergangszustands des His287-Restes. Außerdem konnte ein für die Katalyse förderlicher Einfluss der hydrophoben Methylgruppe des Alanins an der Position 271 sowie ein für die Substratumsetzung stark hemmender Effekt des Asparagins an der Position 287 gezeigt werden. Die His224-, His181- und His274-Reste können aufgrund ihrer Position im Protein nur einen minimalen, indirekten Einfluss auf die Katalyse haben. Im Falle von His181 sowie His274 hängt dies vermutlich mit dem Wasserstoffbrückennetzwerk in dem durch die DFPase hindurchführenden Tunnel zusammen, wodurch anscheinend die Aktivität im aktiven Zentrum mit beeinflusst wird (s. Abschn. 3.2.3).

3.4.2 Kinetische Messungen der Wildtyp-DFPase mit anderen Substraten

Dass die DFPase aus *Loligo vulgaris* neben DFP auch Soman, Sarin und Tabun hydrolysieren kann, wurde erstmals von Schulz et al. beschrieben; allerdings wurde für

Ergebnisse und Diskussion

diese Experimente natives, aus Tintenfischkopfganglien isoliertes Protein eingesetzt (Schulz et al., 1987). Eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit bestand darin, die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten Wildtyp-DFPase mit diesen anderen Substraten zu untersuchen. Die kinetischen Messungen der DFPase mit den Substraten Soman (1,2,2-Trimethylpropyl-Methylphosphonofluorid), Sarin (Isopropyl-Methylphosphonofluorid) und Tabun (N, N-Dimethylphosphoramidocyanid) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. André Richardt, Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien, ABC-Schutz, Munster, durchgeführt.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der durch die Wildtyp-DFPase katalysierten Hydrolysereaktion erfolgte für die anderen Substrate analog zu den Messungen mit DFP als Substrat. Hierfür wurde ausschließlich die pH-Stat-Methode eingesetzt und eine 1%ige ethanolische Stammlösung des jeweiligen Substrats verwendet, wie in den Abschn. 2.5.5 und 3.5 beschrieben.

Substrat	spez. Aktivität	V_{\max}	K_M
	[$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	[$\text{mol}/\text{l} \cdot \text{min } 10^5$]	[mM]
DFP	208 ± 13	$0,75 \pm 0,2$ (1,77)	$0,54 \pm 0,1$ (1,02)
Sarin	109 ± 10	$1,21 \pm 0,15$ (0,52)	$1,05 \pm 0,2$ (4,9)
Soman	77 ± 8	$0,81 \pm 0,1$ (0,6)	$0,41 \pm 0,1$ (2,99)
Tabun	37 ± 4	$1,93 \pm 0,3$	$1,23 \pm 0,2$

Tabelle 3.14: Kinetische Parameter für die Umsetzung von DFP, Sarin, Soman und Tabun durch rekombinante Wildtyp-DFPase. Alle Messungen wurden bei 25 °C und pH 7,0 durchgeführt. Die in der Tabelle dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Meßreihen. Die in Klammern gesetzten Werte sind von Schulz et al. mit der nativen DFPase ermittelt worden (Schulz et al., 1987).

Schulz et al. (1987) hatten gezeigt, dass die DFPase aus *Loligo vulgaris* das DFP schneller hydrolysiert als Soman und Sarin, wobei die Substrataffinität der DFPase für Soman und Sarin um einen Faktor 3 bzw. 5 geringer ist als für DFP (s. Tab. 3.14). Die Messungen mit

Ergebnisse und Diskussion

der rekombinanten Wildtyp-DFPase hingegen ergaben, dass Sarin mit einer um 60% und Tabun mit einer um 150% höheren Geschwindigkeit hydrolysiert werden als DFP, während Soman mit annähernd der gleichen Geschwindigkeit gespalten wird. Weiterhin besitzt die DFPase eine um einen Faktor zwei geringere Affinität für Sarin und Tabun als für DFP, während sie eine etwas höhere Affinität für Soman aufweist.

Die von Schulz et al. (1987) bestimmte spezifische Aktivität für die native DFPase betrug 100 ± 50 U/mg, während die von Dr. Judith Hartleib und in dieser Arbeit bestimmte spezifische Aktivität der rekombinanten Wildtyp-DFPase sehr viel genauer (208 ± 13 U/mg) festgelegt werden konnte. Desweiteren ergaben sich Unterschiede in den K_M - und V_{max} -Werten, wobei der von Schulz et al. bestimmte K_M -Wert von 1,02 mM und der V_{max} -Wert von $1,77 \text{ mol/l} \cdot \text{min} \cdot 10^5$ (25 °C, pH 7,5) fast zweimal- bzw. zweieinhalbmal größer sind als für die rekombinante Wildtyp-DFPase. Entsprechend weichen auch die K_M - und V_{max} -Werte der Wildtyp-DFPase mit Sarin und Soman als Substrate von den früheren Messungen ab. Diese Diskrepanzen zwischen den von Schulz et al. beschriebenen und den hier dargestellten Daten sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die älteren Messungen mit inhomogenen Proteinproben durchgeführt wurden.

Wie durch Modellierungsversuche des DFP im aktiven Zentrum der DFPase gezeigt wurde, kann die eine Isopropylseitenkette des DFP zwischen den hydrophoben Ringsystemen von F173 und W244 liegen, während die andere Isopropylgruppe gleichzeitig in einer aus den Seitenketten der Reste P36, I72 und A74 bestehenden hydrophoben Tasche positioniert ist (Scharff, 2000). Aus dieser Anordnung geht hervor, dass die Bindung des Substrats vermutlich hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht.

Soman besitzt zwei chirale Kohlenstoffatome und kommt daher in vier stereoisomeren Formen vor, während es von Sarin aufgrund eines einzelnen chiralen Kohlenstoffatoms lediglich zwei Enantiomere gibt. In beiden Fällen werden die Stereoisomeren unterschiedlich schnell hydrolysiert (Hoskin & Roush, 1982). Da es sich aber bei den für die Experimente eingesetzten Soman- und Sarin-Stammlösungen um Racemate handelt, kann keine Aussage über die Hydrolysegeschwindigkeit der einzelnen Stereoisomeren

Ergebnisse und Diskussion

gemacht werden. Die geringfügig höhere Affinität der DFPase für Soman ist wahrscheinlich auf den durch den größeren Alkoxyrest bedingte erhöhten hydrophoben Charakter zurückzuführen. Allerdings werden jene Stereoisomeren, bei denen aus sterischen Gründen der Alkoxyrest nicht mit dem hydrophoben Teil der Bindungstasche wechselwirken kann, vermutlich schlechter gebunden.

Enzymquelle	Substrat	k_{cat}	k_{cat}/K_M	spez. Aktivität
		$[s^{-1}]$	$[s^{-1} M^{-1}]$	$[\mu mol /min * mg]$
<i>L. vulgaris</i> (diese Arbeit)	DFP	109	$2 \cdot 10^5$	208 ± 13
	Soman	118	$2,9 \cdot 10^5$	77 ± 8
	Sarin	177	$1,7 \cdot 10^5$	109 ± 10
	Tabun	106	$1,7 \cdot 10^5$	37 ± 4
<i>L. vulgaris</i> (Schulz, 1987)	DFP	106	$9,4 \cdot 10^4$	100 ± 50
	Soman	33,4	$1,1 \cdot 10^4$	n. a.
	Sarin	29	$6 \cdot 10^3$	n. a.
<i>L. palei</i> KG (Garden et al., 1975)	DFP	n. a.	n. a.	0,111
	Tabun	n. a.	n. a.	0,0046
<i>L. palei</i> HP Garden et al., 1975	DFP	n. a.	n. a.	0,099
	Tabun	n. a.	n. a.	0,013
<i>L. opalescens</i> HP (Rajan et al., 1987)	DFP	n. a.	n. a.	113,3
<i>L. opalescens</i> KG (Rajan et al., 1987)	DFP	n. a.	n. a.	42,5
<i>P. diminuta</i> (diSioudi et al., 1999; Dumas et al., 1990a)	DFP	41	$7,8 \cdot 10^4$	n. a.
	Soman	4,8	$9,6 \cdot 10^3$	n. a.
	Sarin	56	$8 \cdot 10^4$	n. a.
<i>Alteromonas</i> (Cheng et al., 1996a; 1999)	DFP	1650	n. a.	n. a.
	Soman	3145	n. a.	n. a.
	Sarin	611	n. a.	n. a.
	Tabun	85	n. a.	n. a.
<i>E. coli</i> (Hoskin et al., 1984)	DFP	n. a.	n. a.	15
	Soman	n. a.	n. a.	153

Ergebnisse und Diskussion

Enzymquelle	Substrat	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	spez. Aktivität [μmol /min * mg]
<i>L. vulgaris</i> (Hoskin et al., 1984)	DFP	n. a.	n. a.	3
	Soman	n. a.	n. a.	58
<i>Rangia cuneata</i> (Landis et al., 1987)	DFP	n. a.	n. a.	1
	Soman	n. a.	n. a.	15
<i>S. cerevisiae</i> (Hoskin et al., 1984)	DFP	n. a.	n. a.	1
	Soman	n. a.	n. a.	8
<i>T. thermophila</i> (Landis et al., 1987)	DFP	n. a.	n. a.	0,059 – 0,194
	Soman	n. a.	n. a.	0,162 – 0,849
Schweineniere (Hoskin et al., 1984)	DFP	n. a.	n. a.	12,4
	Soman	n. a.	n. a.	9,2
Humanserum (Josse et al., 1999a; Davies et al., 1996)	DFP	n. a.	6,2*10 ²	n. a.
	Soman	n. a.	4,7*10 ⁴	n. a.
	Sarin	n. a.	1,5*10 ⁴	n. a.
Rattenleber (Little et al., 1989)	DFP	n. a.	n. a.	0,054
	Soman	n. a.	n. a.	0,718
	Sarin	n. a.	n. a.	2,694
	Tabun	n. a.	n. a.	0,586

Tab. 3.15: Hydrolyse von DFP, Sarin, Soman und Tabun durch unterschiedliche Enzyme. Abkürzungen: KG = Kopfganglion, HP = Hepatopankreas, na = nicht angegeben. Alle hier aufgelisteten Werte entsprechen den in der Literatur angegebenen Maximalwerte und sind teilweise unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen erhalten worden.

Sarin und Tabun besitzen weniger hydrophobe Seitenketten als Soman und DFP; vermutlich deshalb weist die DFPase eine erheblich geringere Affinität für diese Organophosphate auf. Die höhere Umsatzrate von Sarin und Tabun verglichen mit der des Wildtyps ist durch eine schwächere, weniger spezifische Bindung und dadurch schnellere Umsetzung des Substrats zu erklären. Weiterhin könnte die schnellere Hydrolyse von

Tabun auch noch mit der CN⁻-Abgangsgruppe zusammenhängen, die im Übergangszustand vermutlich nicht wie das Fluoridion durch eine Wasserstoffbrücke mit der Aminogruppe des N120 (s. Abb. 1.4) zwischenzeitlich stabilisiert wird.

Das DFP, dessen symmetrische Struktur mit zwei mittelgroßen Isopropylgruppen optimal in die hydrophoben Seitentaschen der Substratbindungsstelle passen, weist von allen hier untersuchten Organophosphaten die höchste spezifische Aktivität auf. Sarin und Soman besitzen unterschiedlich große Seitenketten und liegen in Form von Racematen vor. So werden diese Seitenketten während der Hydrolysereaktion mit unterschiedlichen Affinitäten in der Substratbindungstasche gebunden. Dies führt vermutlich zu einer stereoselektiven Wichtung der durch die DFPase katalysierten Reaktion. Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte für die Wechselzahl k_{cat} , die katalytische Spezifität $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ sowie die spezifische Aktivität der rekombinanten DFPase gegenüber den vier Substraten DFP, Soman, Sarin und Tabun mit Enzymen aus anderen Quellen (Tab. 3.15), so stellt man fest, dass außer den Enzymen aus *Alteromonas*- und *E. coli* die Tintenfisch-DFPase die höchsten Umsatzraten für alle vier Substrate aufweist.

3.5. Metallaustausch in der DFPase

3.5.1 Einbau zwei- und dreiwertiger Metallionen

Die DFPase enthält ein hoch- (Ca-2) und ein niederaffines (Ca-1) Calciumion. Die Dissoziationskonstanten betragen 21 und 840 nM für das Ca-1 mit bzw. ohne KCl sowie 5,3 nM für das Ca-2. Das Ca-2 liegt tief in dem durch die DFPase hindurchführenden Tunnel und ist für die Strukturstabilität des Enzyms von großer Bedeutung (Hartleib et al., 2001). Das Ca-1 spielt für die katalytische Aktivität der DFPase eine essentielle Rolle, da es für die Bindung und Orientierung des Substrats in dem aktiven Zentrum mitverantwortlich ist (Scharff et al., 2001a). Mutanten, bei denen das Ca-1 Atom fehlt, weisen daher keine enzymatische Aktivität auf. Ziel des Metallaustausches war es zum Einen, den Einfluss des Ca-1 Ions auf die Enzymaktivität weiter zu untersuchen. Desweiteren sollten paramagnetische Metalle an dieser Position eingeführt werden, welche

Ergebnisse und Diskussion

zur Ausrichtung des Proteins im Magnetfeld führen und dadurch die Messung von "residual dipolar couplings" mittels NMR ermöglichen, die um weitere Strukturinformationen über das Protein zu erhalten (Lee & Sykes, 1983; Bentrop et al., 1997).

Der Metallaustausch in der DFPase erfolgte durch Gleichgewichtsdialyse, da andere Metallaustauschmethoden bei der DFPase zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führten (Scharff, 2000). Hierbei fand der Austausch der im Protein gebundenen Metallionen, welcher von der jeweiligen Bindungskonstante abhängig war, in Gegenwart eines hohen Überschusses des einzubauenden Metallions statt (Sytkowski, 1977; Maret et al., 1979). Neben Co^{2+} wurden auch die Lanthaniden Tm^{3+} , Ho^{3+} , Tb^{3+} und Er^{3+} und Yt^{3+} eingesetzt.

Metall	Bedingungen: Zeit, [Me]	Ca pro Proteinmolekül	Metall pro Proteinmolekül	Aktivität (%)
Co^{2+}	3 Tage, 2 mM Co^{2+}	$1,4 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$	108%
Tm^{3+}	5 Tage, 0,5 mM Tm^{3+} , 1 mM NaCl	$1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$	5%
	5 Tage, 0,5 mM Tm^{3+} , 5 mM NaCl	$0,7 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$	23%
	5 Tage, 0,5 mM Tm^{3+} , 10 mM	$0,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	13%
Ho^{3+}	7 Tage, 2 mM Ho^{3+}	$3,9 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,5$	1%
	7 Tage, 2 mM Ho^{3+} , 10 mM NaCl	$4,2 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,4$	1%
Yt^{3+}	7 Tage, 2 mM Yt^{3+}	$3,9 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,4$	0%
	7 Tage, 2 mM Yt^{3+} , 10 mM NaCl	$4,2 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,5$	0%
Er^{3+}	7 Tage, 2 mM Er^{3+}	$2,8 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,4$	0%
	7 Tage, 2 mM Er^{3+} , 10 mM NaCl	$2,7 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,4$	0%
Tb^{3+}	7 Tage, 0,5 mM Tb^{3+} , 10 mM NaCl	$0,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	1%
	7 Tage, 0,5 mM Tb^{3+} , 100 mM NaCl	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	1%

Tabelle 3.16: Zusammenfassung der Ergebnisse des Metallaustausches durch Gleichgewichtsdialyse gegen verschiedene Metallionen. Die Enzymaktivitäten wurden mittels der pH-Stat-Methode bestimmt und mit der für die Gleichgewichtsdialyse verwendeten DFPase-Lösung (=100%) verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Alle Gleichgewichtsdialysen wurden mit Metallkonzentrationen von 0,5 – 2 mM bei 4 °C und verschiedenen NaCl-Konzentrationen über einen Zeitraum von drei bis sieben Tagen durchgeführt (s. Abschn. 2.4.6). Der Metallgehalt der Proteinproben wurde nach jedem Tag der Dialyse mittels TXRF analysiert, so dass die exakt benötigte Zeit für den vollständigen Metalleinbau bestimmt werden konnte (s. Abschn. 2.6.2).

Der Austausch von nur einem Ca-Atom gegen Co^{2+} erfolgte nach dreitägiger Gleichgewichtsdialyse ohne nennenswerten Effekt auf die Aktivität der DFPase (s. Tab. 3.16). Demzufolge scheint das in der DFPase eingebaute Co^{2+} ähnliche funktionelle Eigenschaften wie das Ca-1 zu besitzen. Allerdings weist das mit Co^{2+} -derivatisierte Protein eine niedrigere Stabilität als die native DFPase auf, wie die NMR-Messungen gezeigt haben (s.u.). Die dadurch niedrigere Dissoziationskonstante des Ca-2 lässt darauf schließen, dass lediglich das Ca-1 gegen Co^{2+} ausgetauscht wurde.

Die Gleichgewichtsdialyse der nativen DFPase gegen 2 mM Ho^{3+} , Yt^{3+} und Er^{3+} führte zur Aggregation und Präzipitation des Proteins, welche auch durch den Zusatz von 10 mM NaCl nur geringfügig vermieden werden konnte (s. Tab. 3.16). Die in Lösung verbliebene, derivatisierte DFPase zeigte eine große Anzahl von gebundenen Metallionen, was auf zusätzliche Bindungsstellen hindeutet, deren Besetzung möglicherweise zu der Präzipitation aufgrund von Aggregation oder konformationellen Änderungen führt. Durch eine anschließende dreitägige Dialyse dieser Proben gegen Metallionen-freien Puffer wurde die Anzahl der Metallionen pro Proteinmolekül auf zwei gesenkt. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den zusätzlichen Bindungsstellen um niederaffine Bindungsstellen handelt.

Während die Gleichgewichtsdialyse gegen 1 mM Tm^{3+} - auch in Gegenwart unterschiedlicher NaCl Konzentrationen – teilweise zu einer Präzipitation des Proteins führte, war der Ansatz mit 0,5 mM Tm^{3+} in Kombination mit 1 – 10 mM NaCl erfolgreich. Nach fünftägiger Dialyse konnte auf diese Weise ein Ca-Ion gegen Tm^{3+} ausgetauscht werden. Da die derivatisierte Proteinprobe eine sehr geringe enzymatische Aktivität aufwies, scheint das Tm^{3+} ebenfalls das niederaffine Ca-1 ersetzt zu haben.

Tb^{3+} wird häufig zur Untersuchung von Ca-Bindungsstellen in Proteinen verwendet, weil es eine vergleichbare Größe besitzt (Martin et al., 1979; Feenay et al., 2001), und weil es eine der höchsten Suszeptibilitäts-Anisotropien innerhalb der Lanthanidenreihe aufweist (Horrocks et al., 1972). Der Einbau eines Tb^{3+} -Ions erfolgte durch siebentägige Gleichgewichtsdialyse gegen 0,5 mM Tb^{3+} in Gegenwart von 10 – 100 mM NaCl. Hierbei veränderte sich der Metallgehalt der Proteinprobe auf 0,2 – 0,4 Ca^{2+} und 0,7 – 0,9 Tb^{3+} pro Proteinmolekül, was auf den Verlust eines der beiden Metallionen im Protein hindeutet. Außerdem wies die derivatisierte DFPase-Probe, wie im Fall von Tm^{3+} , eine sehr geringe Enzymaktivität auf, was die Vermutung nahelegt, daß es sich bei dem verlorenen Metallion um das in der Ca-1 Bindungsstelle handelt.

Der problematische Einbau der Lanthanide in die DFPase hängt vermutlich in erster Linie mit der unterschiedlichen Wertigkeit der Ionen zusammen, für welche die niederaffine Metallbindungsstelle des Proteins ungeeignet erscheint. Obwohl Lanthanide ähnliche Ionenradien wie das Ca-Ion haben, dürfte aufgrund derer trivalenten Wertigkeit die geometrische Anordnung an der Ca-1-Bindungsstelle verändert werden (Holleman & Wiberg, 1995). Folglich führt möglicherweise eine Konformationsänderung der Ca-1-Bindungsstelle zum Verlust der enzymatischen Aktivität der derivatisierten Proteine. Während der Einbau von Ho^{3+} , Yt^{3+} oder Er^{3+} zur Proteinpräzipitation und Besetzung zusätzlicher niederaffiner Metallbindungsstellen resultierte, führte der Einbau von Tb^{3+} zum Verlust eines der beiden Metallionen und gleichzeitig der Enzymaktivität. Im Gegensatz hierzu war die Stöchiometrie der Metalle in der Tm^{3+} -derivatisierten DFPase in Gegenwart von NaCl nahezu 1:1. Zudem zeigten diese Proteinproben geringfügig katalytische Aktivität, was auf weniger gravierende konformationelle Änderungen im aktiven Zentrum hindeutet.

3.5.2 Einbau paramagnetischer Metallionen für NMR-spektroskopische Untersuchungen

Für NMR-Messungen wurden ^{15}N -markierte, mit Co^{2+} oder Tm^{3+} derivatisierte Proben hergestellt. Hierfür wurde eine homogene, ^{15}N -markierte DFPase-Lösung (s. Abschn.

2.4.3.1) für drei Tage gegen 2 mM Co^{2+} bzw. für fünf Tage gegen 0,5 mM Tm^{3+} und 5 mM NaCl dialysiert. Von der ^{15}N -markierten Tm^{3+} -DFPase wurden $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY ("transverse relaxation-optimized spectroscopy") Spektren und von der ^{15}N -markierte Co^{2+} -DFPase zusätzlich gekoppelte $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC ("heteronuclear single-quantum coherence") Spektren aufgenommen. Die TROSY-Spektren wurden, wie üblich für größere Proteine, deshalb aufgenommen, um festzustellen, ob das Protein richtig gefaltet ist, und ob das paramagnetische Metall eingebaut worden ist. Mit den gekoppelten HSQC-Experimenten konnte ebenfalls festgestellt werden, dass der paramagnetische Kern eingebaut wurde, da zumindest in der Umgebung dieses Kerns Änderungen der Intensitätsverteilungen innerhalb der NH-Multipletts zu beobachten waren.

Während die ^{15}N -markierte Co^{2+} -DFPase Probe ausschließlich derivatisierte Proteinmoleküle enthielt und über mehrere Wochen stabil blieb, zeigte die ^{15}N -markierte Tm^{3+} -DFPase Probe zwei Signalsätze, wovon einer dem Spektrum der nativen DFPase entsprach. Außerdem war nach sechs Wochen ein großer Teil der Tm^{3+} -DFPase Probe ausgefallen. Im TROSY-Spektrum waren anschließend nur noch Signale der nativen DFPase zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Tm^{3+} -DFPase weniger stabil war und nach einigen Wochen präzipitierte.

Während die katalytische Aktivität der DFPase durch den Einbau von bivalenten Metallionen in der Ca-1-Bindungsstelle erhalten bleibt (Scharff, 2000), resultiert der Einbau von dreiwertigen Metallionen meist in einem kompletten Verlust der Enzymaktivität. Dies ist eine weitere Bestätigung für die Notwendigkeit eines bivalenten Metallions im aktiven Zentrum, um die Funktionalität des Enzyms zu gewährleisten. Neben dem erfolgreichen Co^{2+} -Einbau, konnten auch frisch präparierte Tm^{3+} -DFPase Proben für die Messung von "residual dipolar couplings" mittels NMR erfolgreich eingesetzt werden. Nachdem durch die TROSY- sowie die gekoppelten HSQC-Experimente gezeigt werden konnte, dass der durch das eingebaute paramagnetische Co^{2+} bzw. Tm^{3+} gewünschte Effekt tatsächlich auftrat, war es möglich, anhand der Orientierungen der N-H-Bindungen relativ zum Co^{2+} -Ion zusätzliche Strukturinformationen abzuleiten.

3.6 Ausblick

Die Charakterisierung aller in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mutanten hat viele neue Informationen über die Substratbindungseigenschaften sowie die an der Substratbindung und –umsetzung beteiligten Aminosäuren geliefert. Allerdings ist für das genaue Verständnis der Substratbindung und des katalytischen Mechanismus eine NMR-Lösungsstruktur oder eine Röntgenkristallstruktur eines Protein-Substrat-Komplexes notwendig. In erster Linie sollte deshalb durch Variation sowohl der Kristallisationsbedingungen als auch der Inhibitorkonzentrationen, der Inkubationszeit und –temperatur versucht werden, einen solchen Komplex zu erhalten. Hierfür könnten entweder die in dieser Arbeit schon eingesetzten Inhibitoren oder aber weitere, für die PTE beschriebene Substratanaloga eingesetzt werden.

Zum besseren Verständnis der funktionellen Rolle einiger jener Aminosäurereste, welche sich in dieser Arbeit als wichtig für die Katalyse herausgestellt haben, wäre es sinnvoll, die diese Reste betreffenden DFPase-Mutanten zu kristallisieren und strukturell zu charakterisieren. Hierzu gehören hauptsächlich die am Wasserstoffbrückennetzwerk im zentralen Tunnel des Enzyms beteiligten Reste. Die Erzeugung weiterer Mutanten dieser Reste würde die Rolle dieses Netzwerks an der Katalyse und an der Strukturstabilität der DFPase weiter aufklären.

Wie am Beispiel der PTE gezeigt worden war, ermöglicht eine gezielte Mutagenese neben der Steigerung der Hydrolyserate der enzymatischen Reaktion gegebenenfalls auch eine Veränderung der Substratspezifität des Enzyms. Deshalb wäre es sehr sinnvoll, alle vorliegenden Mutanten mit den anderen Substraten der DFPase, d.h. Soman, Sarin, Tabun und Cyclosarin, in Zusammenarbeit mit dem Wehrwissenschaftlichen Institut für Schutztechnologien (ABC-Schutz, Munster) kinetisch zu untersuchen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einige der Mutanten bereits mit Soman, Sarin und Tabun untersucht; allerdings konnten dabei aus Mangel an Qualität der eingesetzten Substratlösungen keine zufriedenstellenden Daten erhalten werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass einige der bereits vorhandenen Mutanten auch in der Lage sein könnten,

Ergebnisse und Diskussion

den Kampfstoff VX (O-Ethyl-S-diisopropylaminoethyl-methylthiophosphonat, s. Abb. 1.1) zu hydrolysieren. Ein analytisches System, dass diese Reaktion nachweisen kann, sollte entwickelt und eingesetzt werden.

Zuletzt bleibt weiterhin die Frage nach der natürlichen Funktion der DFPase noch unbeantwortet. Aufgrund dessen, dass die DFPase aus *L. vulgaris* keine signifikante Sequenzhomologie mit bekannten Proteinen aufweist, können keine Vergleiche oder Schlüsse über ihre mögliche natürliche Funktion gezogen werden. Einer von Landis et al. (1985) postulierten Beteiligung der OPA-Anhydrase am Phospho- bzw. Phosphonolipid-Stoffwechsel sollte eventuell auch im Falle der DFPase aus *L. vulgaris* genauer nachgegangen werden.

4. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, mittels gezielter Mutagenese den postulierten Reaktionsmechanismus der durch die DFPase katalysierten Reaktion zu untermauern und gegebenenfalls weitere an der Hydrolysereaktion beteiligte Reste zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Rolle der Ca-1 Liganden untersucht. Hierbei ergab sich, dass sowohl die Nettoladung an der Ca-1-Bindungsstelle als auch die Positionen der Ladungen für den Erhalt der katalytischen Aktivität des Enzyms von Bedeutung sind. Die Einführung einer dritten negativen Ladung in der Bindungsstelle führte zum nahezu kompletten Aktivitätsverlust, was, wie die kristallographischen Untersuchungen der N175D-Mutante ergaben, hauptsächlich auf die veränderte Elektrostatik in der Bindungsstelle zurückzuführen ist.

Durch eine Reihe von Mutationen des für die katalytische Aktivität als essentiell beschriebenen His287-Restes konnte gezeigt werden, dass auch andere, hydrophobe Reste an dieser Position die Katalyse ermöglichen. Die Fähigkeit dieser Reste, Wasserstoffbrücken mit Trp244 auszubilden, könnte für die Katalyse zwar förderlich sein, ist aber nicht unbedingt notwendig. Außerdem scheint die vom His287 vermutlich durchgeführte Aktivierung des hydrolytischen Wassermoleküls ebenfalls nicht essentiell für die enzymatische DFP-Spaltung zu sein. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte der von Scharff et al. (2001a) vorgeschlagene Reaktionsmechanismus zumindest teilweise bestätigt werden. Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass die katalytische Reaktion auch ohne einige der in der Wildtyp-DFPase gegebenen Voraussetzungen - wie das Bestehen einer Wasserstoffbrücke zwischen His287 und Trp244, sowie eine durch das His287 durchgeführte Wasseraktivierung - ablaufen kann.

Es konnte außerdem mittels gezielter Mutagenese gezeigt werden, dass die hydrophoben Anteile in der gesamten Substratbindungstasche und speziell an der Position 173 für die Substratbindung und -umsetzung eine wichtige Rolle spielen.

Zusammenfassung

Wie bereits bekannt, ist das Ca^{2+} Ion für die Stabilität der DFPase von großer Bedeutung. Mit Hilfe einer Mutation an der Ca^{2+} -Bindungsstelle konnte gezeigt werden, dass der Verlust einer negativen Ladung die Koordination des Ca^{2+} Ions offensichtlich abschwächt. Die Position des Calciumions konnte in der D232S-Mutante nicht eindeutig definiert werden, obwohl die Struktur und die Aktivität des Enzyms intakt geblieben sind. Außerdem wurden, bedingt durch die Einführung dieser Mutation, geringe strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum des Enzyms hervorgerufen, was auf Wechselwirkungen zwischen den beiden Calciumbindungsstellen hindeutet. Dies könnte auf das ausgedehnte Wasserstoffbrückennetzwerk im Inneren des die DFPase durchspannenden Tunnels zurückzuführen sein.

Die Untersuchung verschiedener anderer, im zentralen Tunnel der DFPase gelegener Reste deutet ebenfalls auf die Existenz eines solchen Wasserstoffbrückennetzwerks hin, welches für die Aufrechterhaltung der katalytischen Funktion sowie der Strukturstabilität der DFPase von erheblicher Bedeutung zu sein scheint.

Die für die Reste His287, Glu37, Ser271 postulierte Beteiligung an der katalytischen Reaktion konnte durch die Bestimmung der kinetischen Parameter dieser Mutanten untermauert werden. Die H287N-Mutante besitzt sehr niedrige K_M - und V_{\max} -Werte, was die Bedeutung dieses Restes für die Katalyse unterstreicht. Kinetische Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal mit dem rekombinanten Enzym und außerdem auch den DFPase-Substraten Sarin, Soman und Tabun durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen haben gezeigt, dass die DFPase auch zur Dekontamination dieser letztgenannten Organophosphate effizient eingesetzt werden kann.

Schließlich konnte mittels Gleichgewichtsdialyse das niederaffin gebundene Calciumion der DFPase gegen Co^{2+} und Tm^{3+} ausgetauscht werden. Da die Verwendung dieser Metalle für NMR-spektroskopische Messungen von "residual dipolar couplings" gedacht war, wurden ^{15}N -angereicherte Proben des derivatisierten Proteins hergestellt, welche die für die NMR-Experimente notwendige Stabilität besaßen.

5. Literaturverzeichnis

- Aldrige, W. N. (1953) *Biochem. J.* **53**, 117-124.
- Aldrige, W. N.; Reiner, E. (1972) In "Enzyme Inhibitors as Substrates" (Tatum, E. L.; Neuberger, A.; Eds), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Seiten 8-37.
- Amann, E.; Brosius, J. (1985) *Gene* **40**, 183-190.
- Anderson, S. P.; Durst, H.; Landis, W. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* **91C**, 575-578.
- Attaway, H.; Nelson, J. O.; Baya, A. M.; Voll, M. J.; White, W. E.; Grimes, D. J.; Banzon, J. A.; Kuo, J. M.; Miles, B. W.; Fischer, D. R.; Stang, P. J.; Raushel, F. M. (1995a) *Biochemistry* **34**, 743-749.
- Banzon J. A.; Kuo, J. M.; Fischer, D. R.; Stang, P. J.; Raushel F. M. (1995b) *Biochemistry* **34**, 750-754.
- Bax, A.; Summers, M. F. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093-2094.
- Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. (1994) *Biochemistry* **33**, 15001-15007.
- Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. (1995) *Biochemistry* **34**, 7973-7978.
- Benning, M. M.; Hong, S. B.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. (2000) *J Biol Chem.* **275**, 30556-30560.
- Bentrop, D.; Bertini, I.; Cremonini, M. A.; Forsén, S.; Luchinat, C.; Malmenda, A. (1997) *Biochemistry* **36**, 11605-11618.
- Berger, S. L. (1975) *Anal. Biochem.* **67**, 428-437.
- Betzel, C.; Pal, G. P.; Saenger, W. (1988) *Eur. J. Biochem.* **178**, 155-171.
- Biggadike, K.; Angell, R. M.; Burgess, C. M.; Farrell, R. M.; Hancock, A. P.; Harker, A. J.; Irving, W. R.; Ioannou, C.; Procopiou, P. A.; Shaw, R. E.; Solanke, Y. E.; Singh, O. M.; Snowden, M. A.; Stubbs, R. J.; Walten, S.; Weston, H. E. (2000) *J. Med. Chem.* **43**, 19-21.
- Billecke, S. S.; Primo-Parmo, S. L.; Dunlop, C. S.; Doorn, J. A.; La Du, B. N.; Broomfield, C. A. (1999) *Chem.-Biol. Interactions* **119-120**, 251-256.
- Black, S.D.; Mould, D.R. (1991) *Anal. Biochem.* **193**, 72-82.
- Birnboim, H.; Doley, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1524.
- Briggs, G. E.; Haldane, J. B. S. (1925) *Biochem. J.* **19**, 338.

- Broomfield, C. A.; Lockridge, O.; Millard, C. B. (1999) *Chem.-Biol. Interact.* **119-120**, 413-418.
- Brosius, J.; Erfle, M.; Storella, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3539-3541.
- Brünger A. T. (1992) *Nature* **355**, 472-474.
- Bryant, D. T. W., Andrews, P. (1984) *Biochem. J.* **220**, 617-620.
- Bullock, W. O.; Fernandez, J. M.; Short, J. M. (1987) *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Caldwell, S. R.; Raushel, F. M. (1991a) *Biochemistry* **30**, 7444-7450.
- Caldwell, S. R.; Raushel, F. M. (1991b) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 730-732.
- Caldwell, S. R.; Newcomb, J. R.; Schlecht, K. A.; Raushel, F. M. (1991c) *Biochemistry* **30**, 7438-7444.
- Chakraborty, A. R., Davidson, A.; Howell, P. L. (1999) *Biochemistry* **38**, 2435-2443.
- Chen, P. F.; Berka, V.; Wu, K. K. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* **411**, 83-92.
- Cheng, T.-C.; Harvey, S.P.; Chen, G.L. (1996a) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1636-1641.
- Cheng, T.-C.; Calomiris, J. J. (1996b) *Enzyme Microbiol. Technol.* **18**, 597-601.
- Cheng, T.-C.; B., L.; Wang, J.; Wu, J.; DeFrank, J. J.; Anderson, D.; Rastog, I. V. K.; Hamilton, A. B. (1997) *J. Ind. Microbiol.* **18**, 49-55.
- Cheng, T.-C.; DeFrank, J. J.; Rastogi, V. K. (1999) *Chem.-Biol. Interact.* **119-120**, 455-462.
- Chettur, G.; DeFrank, J.; Gallo, B.; Hoskin, F. G. C.; Mainer, S.; Robbins, F.; Steinmann, K. E.; Walker, J. E. (1988) *Fundam. Appl. Toxicol.* **11**, 373-380.
- Christianson D. W.; Alexander, R. S. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6412-6419.
- Collet, J.F.; Stroobant, V.; Schaftingen, E.V. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33985-33990.
- Colwell, R. R. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1685-1689.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Cox E. H.; Hunt, J. A.; Compher, K. M.; Fierke, C. A.; Christianson, D. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13687-13694.
- Davis J. P.; Zhou, M.-M.; Van Etten R. L. (1994) *Biochemistry* **33**, 1278-1286.
- Davies, H. G.; Richter, R. J.; Keifer, M.; Broomfield, C. A.; Sowalla, J.; Furlong, C. E. (1996) *Nat. Genet.* **14**, 334-337.
- Deschamps, J. R.; Kopec-Smyth, K.; Poppino, J. L.; Futrovsky, S. L.; Ward, K. B. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.* **106**, 765-768.
- DeFrank, J. J.; Cheng, T. C. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 1938-1943.

- Dierl, S. (1991) Diplomarbeit; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Dierl, S. (1995) Dissertation; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Dierl, S. (1999) Unveröffentlichte Daten; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- DiSioudi, B.; Grimsley, J. K.; Lai, K.; Wild, J. R. (1999) *Biochemistry* **38**, 2866-2872.
- DiTusa C. A.; McCall K. A.; Christensen T.; Mahapatro M.; Fierke C. A.; Toone E. (2001) *Biochemistry* **40**, 5345-5351.
- Donarski, W. J.; Dumas, D. P.; Heitmeyer, D. P.; Lewis, V. E.; Raushel, F. M. (1989) *Biochemistry* **28**, 4650-4655.
- Dudev, T.; Lin, Y.-L.; Dudev, M.; Lim, C. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3168-3180.
- Dufour, E., Storer, A. C.; Menard, R (1995) *Biochemistry* **34**, 16382-16388.
- Dumas, D. P.; Durst, H. D.; Landis, W. G.; Raushel, F. M.; Wild, J. R. (1990a). *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 155-159.
- Dumas, D. P.; Raushel, F. M. (1990b) *J. Biol. Chem.* **265**, 21498-21503.
- Feeney J., Birdsall, B., Bradbury, A.F., Biekofsky, R. R.; Bayley, P.M. (2001) *J. Biomol. NMR* **21**, 41-48.
- Feld, E. A.; Grundfest, H.; Nachmannsohn, D.; Rothenberg, M. A. (1948) *J. Neurophysiol.* **11**, 125-129.
- Friedman, T.; Taylor, P. (1986) *Nature* **319**, 407-409.
- Garden, J. M.; Hause, S. K.; Hoskin, F. C. G.; Roush, A. H. (1975) *Comp. Biochem. Physiol.* **52C**, 95-98.
- Gay, D.; Hoskin, F. C. G. (1979) *Biochem. Pharmacol.* **28**, 1259-1261.
- Gonzalvo, M. C.; Gil, F.; Hernandez, A. F.; Rodrigo, L.; Villanueva, E.; Pla, A. (1998) *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **12**, 61-69.
- Goodspeed, M. C.; Sogorb, M. A.; Wu, F.; Hong, S.B.; Raushel, F. (2001) *Biochemistry* **40**, 1325-1331.
- Ha, N.C.; Oh, B.H. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 147-153.
- Hanahan, D. (1985) DNA cloning. Band I, Seiten 109-136, IRL Press.
- Hartleib, J. (2000) Dissertation; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Hartleib, J.; Geschwindner, S.; Scharff, E. I.; Rüterjans, H. (2001) *Biochem. J.* **353**, 579-589.
- Hartleib, J.; Rüterjans, H. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1546**, 312-324.

- He Q. Y.; Mason A. B.; Woodworth R. C.; Tam B. M.; MacGillivray R. T. A.; Grady J. K.; Chasteen N. D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 17018-17024.
- Heath, D. F. (1961) Organophosphorus poisons: Anticholinesterases and related compounds. Pergamon Press, Oxford.
- Holleman, A. F.; Wiberg, N. (1995) In "Lehrbuch der Anorganischen Chemie", de Gruyter-Verlag, 101. Auflage.
- Holmstedt, B. (1963) In "Handbuch der experimentellen Pharmakologie", Band 15 (Koelle, G. B. Ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Horrocks Jr., W. D.; Sipe, J. P. (1972) *Science* **177**, 994-997.
- Hoskin, F. C. G. (1969a). *Biol. Bull.* **137**, 389-390
- Hoskin, F. C. G. (1971) *Science* **172**, 1243-1245.
- Hoskin, F. C. G.; Long, R. J. (1972) *Archiv. Biochem. Biophys.* **150**, 548-555.
- Hoskin, F.C.G.; Roush, A.H. (1982) *Science* **215**, 1255-1257.
- Hoskin F.C.G.; Prusch, R.D. (1983) *Comp. Biochem. Physiol.* **75**, 17-20.
- Hoskin, F. C. G.; Kirkish, M. A.; Steinmann, K. E. (1984) *Fundam. Appl. Toxicol.* **4**, 165-172.
- Hong, S.-B.; Raushel, F. M. (1996) *Biochemistry* **35**, 10904-10912.
- Hong, S.-B.; Raushel, F. M. (1999) *Biochemistry* **38**, 1159-1165.
- Hoskin, F. C. G.; Rosenberg, P.; Brzin, M. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **55**, 1231-1235.
- Hoskin, F. G. C.; Long, R. (1972) *J. Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 548-555.
- Hoskin, F.C.G.; Roush, A.H. (1982) *Science* **215**, 1255-1257.
- Hoskin, F. G. C.; Kirkish, M. A.; Steinmann, K. E. (1984) *Fundam. Appl. Toxicol.* **4**, 165-172.
- Hoskin, F. C. G. (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2069-2072.
- Hoskin, F.; Rajan, K.; Steinmann, K. (1988) *Bio. Bull.* **175**, 305-306.
- Hoskin, F. C. G. (1990) In "Squid as experimental animals". (Gilbert, D. L.; Adelman, W. J. jr.; Arnold, J. M.; Eds.). Plenum Press, NY, London.
- Hoskin, F. G. C.; Walker, J.; Mello, C. (1999) *Chem.-Biol. Interact.* **119-120**, 399-404.
- Huang C. C.; Lesburg, C. A.; Kiefer L.L.; Fierke C. A.; Christianson, D. W. (1996) *Biochemistry* **35**, 3439-3446.
- Jakubowski, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3957-3962.

- Josse, D.; Xie, W.; Renault, F.; Rochu, D.; Schopfer, L. M.; Masson, P.; Lockridge, O. (1999) *Biochemistry* **38**, 2816-2825.
- Junghans, D. (1995) Diplomarbeit; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Ito, W.; Ishinguro, H.; Kurosawa, Y. (1991) *Gene* **102**, 67-70.
- Kajander T., Merckel, M. C., Thompson A., Deacon, A. M., Mazur P., Kozarich, J. W.; Goldman, A. (2002) *Structure* **10**, 483-492.
- Karalliedde, L.; Senanayake, N. (1989) *Br. J. Anaesth.* **63**, 736-750.
- Kao, L. R.; Motoyama, N.; Dauterman, W. C. (1985) *Pest. Biochem. Phys.* **23**, 66-73.
- Keitel, T.; Meldgaard, M.; Heinemann, U. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 203-214.
- Kiefer L. L.; Paterno, S. A.; Fierke, C. A. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6831-6837.
- Kim, Y.-O.; Kim, J.-K.; Bae, K.-S.; Yu, J.-H.; Oh, T.-K. (1998) *Enzyme Microbiol. Technol.* **22**, 2-7.
- Koepke, J.; Scharff, E. I.; Lücke, C.; Rüterjans, H.; Fritzsche, G. (2003) *Acta Cryst.* in press.
- Kopeck-Smyth, K.; Deschamps, J. R.; Loomis, L. D.; Ward, K. B. (1993) *Chem.-Biol. Interact.* **87**, 49-54.
- Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.* **14**, 51-55.
- Kraulis, P. J. (1991) *Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Kuo, C.-L.; La Du, B. N. (1995) *Drug. Metabol. Dispos.* **23**, 935-944.
- Kuo, J. M.; Chae, M. Y.; Raushel, F. M. (1997) *Biochemistry* **36**, 1982-1988.
- Kuo, C.-L.; La Du, B. N. (1998) *Drug Metabol. Dispos.* **26**, 653-660.
- La Du, B. N. (1992) In "Pharmacogenetics of drug metabolism". (Kalow, W., Ed.), Pergamon Press, Elmford, NY.
- La Du, B. N.; Aviram, M.; Billecke, S.; Navab, M.; Primo-Parmo, S.; Sorenson, R. C.; Standiford, T. J. (1999) *Chem.-Biol. Interact.* **119-120**, 379-388.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Landis, W.G.; Savage, Jr. R. E.; Hoskin, F. C. G. (1985) *J. Protozool.* **32**, 517-519.
- Landis, W. G.; Haley, M. V.; Johnson, D. W. (1986) *J. Protozool.* **33**, 216-218.
- Landis, W.; Haley, D.; Haley, M. J. D.; Dupont, H.; Savage Jr., R. E. (1987) *J. Appl. Toxicol.* **7**, 35-41.
- Lange, W.; von Krüger, G. (1932) *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **65**, 1598-1601.

- Lecker, D. N.; Khan, A. (1998) *Biotechnol. Prog.* **14**, 621-625.
- Lee, L.; Sykes, B. D. (1983) *Biochemistry* **22**, 4366-4373.
- Lesburg, C. A.; Christianson, D. W. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6838-6844.
- Lewis, V. E.; Donarski, W. J.; Wild, J. R.; Raushel, F. M. (1988) *Biochemistry* **27**, 1591-1597.
- Li, W. F.; Furlong, C. E.; Costa, L. G. (1995) *Toxicol. Lett.* **76**, 219-226.
- Liao D. I.; Zheng Y. J.; Viitanen, P. V.; Jordan, D. B. (2002) *Biochemistry* **41**, 1795-1806.
- Little, J. S.; Broomfield, C. A.; Fox-Talbot, M. K.; Boucher, L. J.; MacIver, B.; Lenz, D. E. (1989) *Biochem. Pharmacol.* **38**, 23-29.
- Lockrigde, O.; Blong, R. M.; Masson, P.; Froment, M.-R.; Millard, C. B.; Broomfield, C.A. (1997) *Biochemistry* **36**, 786-795.
- Löhr, F.; Katsemi, V.; Betz, M.; Hartleib J.; Rüterjans, H. (2002) *J. Biomol. NMR* **22**, 153-164.
- Löhr, F.; Katsemi, V.; Hartleib, J.; Günter, U.; Rüterjans, H. (2003) *J. Biomol. NMR* **25**, 291-311.
- Loll, P. J.; Quirk, S.; Lattman, E. E.; Garavito, R. M. (1995) *Biochemistry* **34**, 4316-4324.
- Lünzer, J. (1989) Diplomarbeit; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Lünzer, J. (1992) Dissertation; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Madhu, P.K.; Grandori, R.; Hohenthanner, K.; Manda, P.K.; Müller, N. (2001) *J. Biomol. NMR* **20**, 31-37.
- Malone, J. F.; Murray C. M.; Charlton M. H.; Docherty, R.; Lavery A. J. (1997) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **93**, 3429-3436.
- Mazur, A. (1946) *J. Biol. Chem.* **164**, 271-298.
- Maret, W.; Andersson, I.; Dietrich, H.; Schneider-Bernlöhr, H.; Einarsson, R.; Zeppezauer, M. (1979) *Eur. J. Biochem.* **98**, 501-512.
- Martin, R. B.; Richardson, F. S. (1979) *Q. Rev. Biophys.* **12**, 181-209.
- McCall K. A.; Huang C. C.; Fierke, C. A. (2000) *J. Nutri.* **130**, 1437-1446.
- McPhalen, C. A.; Strynadka, N. C. J.; James, M. N. G. (1991) *Adv. Protein Chem.* **42**, 77-144.
- McRee, D. E. (1993) In "Practical Protein Crystallography", Academic Press, San Diego.
- Mertz P.; Yu L.; Sikkink R.; Rusnak F. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21296-21302.
- Michaelis, L.; Menten, M. L. (1913) *Biochem. Z.* **49**, 333

- Millard, C. B.; Lockridge, O.; Broomfield, C. (1998) *Biochemistry* **37**, 237-247.
- Minor, W.; Steczko, J.; Stec, B.; Otwinowski, Z.; Bolin J. T.; Walter, R.; Axelrod, B. (1996) *Biochemistry* **35**, 1067-1071.
- Morishita, Y.; Hasegawa, K.; Matsuura, Y.; Katsube, Y.; Kubta, M.; Sakai S. (1997) *J. Mol. Biol.* **267**, 661-672.
- Mounter, L. A. (1963) In "Handbuch der experimentellen Pharmakologie", Band 15 Cholinesterases and anticholinesterases (Koelle, G. B. Ed). Springer-Verlag, Berlin.
- Mouchés, C.; Magnin, M.; Berge, J. B.; DeSilvestri, M.; Beyssat, V.; Pasteur, N.; Georghiou, G. P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2113-2116.
- MSI (1997), Insight II: User Guide; San Diego, USA.
- Murshudov G. N., Vagin A. A.; Dodson E. J. (1997) *Acta Cryst.* **D53**, 240-253.
- Nayal, M.; Di Cera, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 817-821.
- Neff, D.; Dencher, N. A. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **259**, 569-575.
- Nicholls, A.; Sharp, K.A.; Honig, B. (1991) *Proteins* **11**, 281-296.
- Ordentlich, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Stein, D.; Ariel, N.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A. (1993) *FEBS Lett.* **334**, 215-220.
- Otwinowski, Z.; Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Perutz, M. F.; Fermi, G.; Abraham, D. J.; Poyart, C.; Bursaux, E. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1064-1078.
- Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wüthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12366-12371.
- Petersen, B. Ø.; Shuman, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3891-3896.
- Pogell, B. M.; Rowland, S. S.; Steinmann, K. E.; Speedie, M. K.; Hoskin, F.G. C. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 610-611.
- Rajan, K. S.; Steinmann, K. E.; Mainer, S.; Hoskin, F. C. G. (1987). Report of the Naval Research Laboratory, Arlington, Virginia, USA.
- Reiner, E. (1993) *Chem.-Biol. Interact.* **87**, 15-16.
- Roseman, M. A. (1988) *J. Mol. Biol.* **200**, 513-522.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989) In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schägger, H.; Cramer, W. A.; von Jagow, G. (1994) *Anal Biochem.* **217(2)**, 220-30.
- Schägger, H.; Brandt, U.; Gencic, S.; von Jagow, G. (1995) *Methods Enzymol.* **260**, 82-96.

Literaturverzeichnis

- Scharff, E. I. (1996) Diplomarbeit; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Scharff E. I. (2000) Dissertation; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Scharff, E. I.; Koepke, J.; Fritzsche, G.; Lücke, C.; Rüterjans, H. (2001a) *Structure* **9**, 493-502.
- Scharff, E. I.; Lücke, C.; Fritzsche, G.; Koepke, J.; Hartleib, J.; Dierl, S.; Rüterjans, H. (2001b) *Acta Cryst.* **D57**, 148-149.
- Schein, C.; Noteborn, M. (1988) *Biotechnology* **1**, 291-295.
- Schrader, G. (1963) In "Die Entwicklung neuer Insektizider Phosphorsäure-Ester". VCH Weinheim.
- Schumacher, M.; Camp, S.; Maulet, Y.; Newton, M.; MacPhee-Quigley, K.; Taylor, S. S.; Schulz, W.; Schäfer, B.; Stroop, G.; Rüterjans, H. (1987) Forschungsbericht für die Fraunhofer-Gesellschaft; Auftrags-Nr. T/R770/D0001/ D1750.
- Schulz (1987) unveröffentlichte Daten; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Scott, D. L.; White, S. P.; Otwinowski, Z.; Yuan, W.; Gelb, M. H.; Sigler, P. B. (1990) *Science* **250**, 1541-1546.
- Sekar, K.; Yu, B. Z.; Rogers, J.; Lutton, J.; Liu, X.; Chen, X.; Tsai, M. D.; Jain, M. K.; Sundaralingam, M. (1997) *Biochemistry* **36**, 3104-3114.
- Shapiro, D.J. (1981) *Anal. Biochem.* **110**, 229-231.
- Shimizu, M. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1266-1269.
- Singh, K.; Modak, J. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11289-11302.
- Sogorb, M. A.; Diaz-Alejo, N.; Escudera, M. A.; Vilanova, E. (1998) *Arch. Toxicol.* **72**, 219-226.
- Sogorb, M. A.; Sanchez, I.; Lopez-Rivadulla, M.; Cespedes, V.; Vilanova, E. (1999) *Drug Metab. Dispos.* **27**, 53-59.
- Stahl, G. (1996) Unveröffentlichte Daten; J. W. Goethe-Universität Frankfurt.
- Stark, I. (1984) *Chemie in unserer Zeit* **18**, 96-106.
- Steiner, T.; Koellner, G. (2001) *J. Mol. Biol.* **305**, 535-557.
- Storkebaum, W.; Witzel, H.; Rüterjans, H. (1975) *Forschungsbericht des Landes Nordrhein-Westfalen* **2523**, 1-22.
- Sytowski, A. J. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 505-517.
- Thoden, J.B.; Miran, S.G.; Phillips, J.C.; Howard, A.J.; Raushel, F.M.; Holden, H.M. (1998) *Biochemistry* **37**, 8825-8831.

Literaturverzeichnis

- Tougou, K.; Nakamura, A.; Watanabe, S.; Okuyama, Y.; Morino, A. (1998) *Drug Metab. Dispos.* **26**, 355-359.
- Vanhooke, J. L.; Benning, M. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. (1996) *Biochemistry* **35**, 6020-6025.
- Vipond, I. B.; Moon, B. J.; Halford, S. E. (1996) *Biochemistry* **35**, 1712-1721.
- Walker, C. H. (1993) *Chem.-Biol. Interact.* **87**, 17-24.
- Wang, F.; Xiao, M.; Mu, S. (1993) *J. Biochem. Toxicol.* **8**, 161-166.
- Warshel, A.; Naray-Szabo, G.; Sussman, F.; Hwang, J. K. (1989) *Biochemistry* **28**, 3629–3637.
- Watkins, L. M.; Mahoney, H. J.; McCulloch, J. K.; Raushel, F. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25596-25601.
- Weber, D. J.; Mullen, G. P.; Mildvan, A. S. (1991) *Biochemistry* **30**, 7425-7437.
- White, S. P.; Scott, D. L.; Otwinowski, Z.; Gelb, M. H.; Sigler, P. B. (1996) *Biochemistry* **35**, 4591-4601.
- Wlodawer, A.; Walter, J.; Huber, R.; Sjölin, L. (1984) *J. Mol. Biol.* **180**, 301-329.
- Workshop, N.A.R. Destruction of Militarily Toxic Materials (1994) Carlton Flower Hotel, Naaldwijk, Niederlande (<http://www.opcw.Nl/chemhaz/arwnaal1.tm>): 22-27 Mai.
- Wulf O. R.; Liddel, W.; Hendricks, S. B. (1936) *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 2287-2293.
- Yu, B.-Z.; Rogers, J.; Nicol, G. R.; Theopold, K. H.; Seshadri, K.; Vishweshwara, S.; Jain, M. K. (1998) *Biochemistry* **37**, 12576-12587.
- Yuan, C.; Byeon I. J.; Li, Y.; Tsai, M. D. (1999) *Biochemistry* **38**, 2909-2918.
- Zech, R.; Zürcher, K. (1973) *Comp. Biochem. Physiol.* **48B**, 427-433.
- Zhang, Y.; Autenrieth, R. L.; Bonner, J. S.; Harvey, S. P.; Wild, J. R. (1999) *Biotech. Bioeng.* **64**, 221-231.
- Zickermann, V.; Wittershagen, A.; Kohlbesen, B.; Ludwig, B. (1997) *Biochemistry* **36**, 3232-3236.

6. Anhang

6.1 Oligodesoxyribonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

N120D [AAT zu GAT]

5'-CCATCTTCTTACGTCCCTACGCTACTAACGCGTAAAC-3' (forward)

5'-GTTTACGCGTTAGTAGCGTAGGGACGTAAGAAGATGG-3' (backward)

N175D [AAT zu GAT]

5'-GCTTTCCAGTTTCCAGATGGTATTGCTGTTCGTCAC-3' (forward)

5'-GTGACGAACAGCAATACCATCTGGAAACTGGAAAGC-3' (backward)

F173W [TTT zu TGG]

5'-GTGGATACTGCTTTCCAGTGGCCAAATGGTATTGC-3' (forward)

5'-GCAATACCATTGTTGGCCACTGGAAAGCAGTATCCAC-3' (backward)

F173L [TTT zu TTA]

5'-GCTTTCCAGTTACCAAATGGTATTGCTGTTCGTCAC-3' (forward)

5'-GTGACGAACAGCAATACCATTGTTGGTAACTGGAAAGC-3' (backward)

F173V [TTT zu GTT]

5'-GTGGATACTGCTTTCCAGGTTCCAAATGGTATTGC-3' (forward)

5'-GCAATACCATTGGAACCTGGAAAGCAGTATCCAC-3' (backward)

F173S [TTT zu TCT]

5'-GTGGATACTGCTTTCCAGTCTCCAAATGGTATTGC-3' (forward)

5'-GCAATACCATTGAGACTGGAAAGCAGTATCCAC-3' (backward)

F173A [TTT zu GCT]

5'-GGATACTGCTTTCCAGGCTCCAAATGGTATTGCTGTTCGTCAC-3' (forward)

5'-GTGACGAACAGCAATACCATTGAGCCTGGAAAGCAGTATCC-3' (backward)

Anhang

F173Y [TTT zu TAT]

5'-GTGGATACTGCTTTCCAGTATCCAAATGGTATTGC-3' (forward)

5'-GCAATACCATTGATGACTGGAAAGCAGTATCCAC-3' (backward)

S271G [AGC zu GGC]

5'-CGTTGCCCATTGAAAAACCCGGCAACTTGCATTTCAGCCC -3' (forward)

5'-GGGCTTGAAATGCAAGTTGCCGGGTTTTTCAAATGGGCAACG-3' (backward)

H224N [CAT zu AAT]

5'-GGGGTCACATCCCAGGTACTAATGAAGGTGGTGCTG-3' (forward)

5'-CAGCACCACTTCATTAGTACCTGGGATGTGACCCC-3' (backward)

S271A [AGC zu GCC]

5'-GCCCATTTGAAAAACCCGCCAACTTGCATTTCAGCC-3' (forward)

5'-GGCTTGAAATGCAAGTTGGCGGGTTTTTCAAATGGGC-3' (backward)

M148A [ATG zu GCG]

5'-CACCCGTTTCAGCGCAGGAAAAATTTGGCAG-3' (forward)

5'-CTGCCAAATTTTTCCTGCGCTGAACGGGTG-3' (backward)

R146S [CTG zu AGT]

5'-GCACCTGCAGACTACACCAGTTCAATGCAGG-3' (forward)

5'-CCTGCATTGAACTGGTGTAGTCTGCAGGTGC-3' (backward)

Y144S [TAC zu TCC]

5'-GTCGCACCTGCAGACTCCACCCGTTCAATGC-3' (forward)

5'-GCATTGAACGGGTGGAGTCTGCAGGTGCGAC-3' (backward)

T195V [ACT zu GTT]

5'-CTAATTGTGGCTGAAGTTCCAACCAAGAACTC-3' (forward)

5'-GAGTTTCTTGGTTGGAAGTTTCAGCCACAATTAG-3' (backward)

Anhang

T195L [ACT zu CTT]

5'-CTAATTGTGGCTGAACTTCCAACCAAGAACTC-3' (forward)

5'-GAGTTTCTTGTTGGAAGTTCAGCCACAATTAG-3' (backward)

T195A [ACT zu GCT]

5'-CTAATTGTGGCTGAAGCTCCAACCAAGAACTC-3' (forward)

5'-GAGTTTCTTGTTGGAGCTTCAGCCACAATTAG-3' (backward)

D232S [GAT zu AGT]

5'-GGTGCTGATGGAATGAGTTTTGATGAAGAC-3' (forward)

5'-GTCTTCATCAAACTCATTCATCAGCAC-3' (backward)

F314A [TTT zu GCT]

5'-GAGACGTTAAAATTTGGAATAGCTTAAAATGCCTGACTC-3' (forward)

5'-GAGTCAGGCATTTTAAGCTATTCCAAATTTTAAGCTCTC-3' (backward)

H287F [CAC zu TTC]

5'-CCATTTTTGTGTCACGGAATTCGAGAACAATGCTGTCTGG-3' (forward)

5'-CCAGACAGCATTGTTCTCGAATTCCGTGACAAAAATGG-3' (backward)

H287W [CAC zu TGG]

5'-CCATTTTTGTGTCACGGAATGGGAGAACAATGCTGTCTGG-3' (forward)

5'-CCAGACAGCATTGTTCTCCCATTCGTGACAAAAATGG-3' (backward)

H287L [CAC zu CTC]

5'-CCATTTTTGTGTCACGGAATTCGAGAACAATGCTGTCTGG-3' (forward)

5'-CCAGACAGCATTGTTCTCGAGTTCCGTGACAAAAATGG-3' (backward)

H287Y [CAC zu TAC]

5'-CCATTTTTGTGTCACGGAATACGAGAACAATGCTGTCTGG-3' (forward)

5'-CCAGACAGCATTGTTCTCGTATTCCGTGACAAAAATGG-3' (backward)

Anhang

H287Q [CAC zu CAG]

5'-CCATTTTTGTCACGGAACAGGAGAACAATGCTGTCTGG-3' (forward)

5'-CCAGACAGCATTGTTCTCCTGTTCCGTGACAAAAATGG-3' (backward)

H287A [CAC zu GCC]

5'-CCATTTTTGTCACGGAAGCCGAGAACAATGCTGTCTGG-3' (forward)

5'-CCAGACAGCATTGTTCTCGGCTTCCGTGACAAAAATGG-3' (backward)

D229N [GAT zu AAT]

5'-GTACTCATGAAGGTGGTGCTAATGGAATGGATTTTGATGAAG-3' (forward)

5'-CTTCATCAAAATCCATTCCATTAGCACCCATTCATGAGTAC--3' (backward)

Q77F [CAA zu TTT]

5'-CCTGCTGGCTGCTTTTGTGATCGAGATGCC-3' (forward)

5'-GGCATCTCGATCACAAAAGCAGCCAGCAGG-3' (backward)

Q77Y [CAA zu TAT]

5'-CCTGCTGGCTGCTATTGTGATCGAGATGCC-3' (forward)

5'-GGCATCTCGATCACAAATAGCAGCCAGCAGG-3' (backward)

Q77W [CAA zu TGG]

5'-CCTGCTGGCTGCTGGTGTGATCGAGATGCC-3' (forward)

5'-GGCATCTCGATCACACCAGCAGCCAGCAGG-3' (backward)

Q304F [CAG zu TTT]

5'-GAAATGGCAAAAAATTTTATTGTGAGACG-3' (forward)

5'-CGTCTCACAATAAAATTTTTGCCATTTC-3' (backward)

Q304W [CAG zu TGG]

5'-GAAATGGCAAAAAATGGTATTGTGAGACG-3' (forward)

5'-CGTCTCACAATACCATTTTTTGCCATTTC-3' (backward)

Anhang

N237S [AAT zu TCT]

5'-GATTTTGATGAAGACTCTAACCTTTTGGTAGCC-3' (forward)

5'-GGCTACCAAAAGGTTAGAGTCTTCATCAAATA-3' (backward)

N272F [AAC zu TTC]

5'-GAAAAACCCAGCTTCTTGCATTTCAAGCCC-3' (forward)

5'-GGGCTTGAAATGCAAGAAGCTGGGTTTTTC-3' (backward)

D121F [GAT zu TTT]

5'-GCAGGGATGCAATTTTGGGCATTTGATTATG-3' (forward)

5'-CAAATGCGCAAAAATTGCATCCCTGCTAATAC-3' (backward)

6.2 Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung

(26)	5'-AAGTGACCGAAGATATACCAGGT-3'
(33)	5'-GAAGAGATTGCCAAAAAAGACTCTGAAGGT-3'
(37)	5'-TCCAAATGGTATTGCTGTTC-3'
(24)	5'-TTGTCTTCATCAAAATCCATTCC-3'
(25)	5'-TCAGCCACAATTAGTTGGTAAGG-3'
(38)	5'-TCC AAA TTT TAA CGT CTC ACA ATA CTG TTT-3'
(39)	5'-CGT CTC ACA ATA CTG TTT-3'
(S40)	5'-AGA ATC CGT TGC CCA TTT GAA-3'
(S41)	5'-CTG CGT TCT GAT TTA ATC-3'

6.3 Enzyme

<i>DpnI</i>	Stratagene GmbH, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
	MBI Fermentas GmbH, St-Leon-Rot
<i>Pfu</i> Turbo TM DNA-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg
Thrombin aus Rind	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

6.4 Chemikalien

Acrylamid-Fertiglösung für denaturierende Protein-Gele (Rotiphorese Gel 30)	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarosen (SeaKem LE)	FMC Bio Products, Rockland, ME, USA
4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefabloc® SC)	Roche, Mannheim
6-Aminocaproat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck GmbH, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Roche, Mannheim
Bacto Yeast Extrakt	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Eggenstein
Bis-Tris-Propane	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cadmiumsulfat Hydrat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Calciumchlorid	Merck GmbH, Darmstadt
Cobalt(II)-chlorid (99,9%)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Coomassie brilliant Blue G-250	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Diethyl-4-methyl-benzyl-phosphonat (98%)	Lancaster Synthesis GmbH, Mühlheim/Main
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Serva GmbH & Co., Heidelberg; Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Diisopropylmethylphosphonat (98%)	Lancaster Synthesis GmbH, Mühlheim/Main
Dimethyl-methylphosphonat (98%)	Lancaster Synthesis GmbH, Mühlheim/Main
Erbium(III)-chlorid (99,9%)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Ethidiumbromid	Merck GmbH, Darmstadt
Fluoride Ion Standard Solution 0,01M	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Holmium(III)-chlorid (99,9%)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Imidazol	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm; Acros Organics, Fisher Scientific, Schwerte

Anhang

Isotopen-Materialien

^{15}N -Ammoniumchlorid (99% ^{15}N)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
$^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose (98-99% ^{13}C)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
Bioexpress DCN-Medium	Cambridge Isotope Lab., Andover, MA, USA

Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid

(IPTG)	MBI Fermentas GmbH, St-Leon-Rot
--------	---------------------------------

Magnesiumchlorid	Merck GmbH, Darmstadt
------------------	-----------------------

Methylenblau	Merck GmbH, Darmstadt
--------------	-----------------------

4-Morpholinpropansulfonsäure	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
------------------------------	--------------------------

3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
-------------------------------------	--------------------------

Natriumazid	Serva GmbH & Co., Heidelberg
-------------	------------------------------

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH & Co., Heidelberg
----------------------------	------------------------------

Nickelsulfat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
--------------	--------------------------

Polyethylenglykol (PEG) 4000,

PEG 6000, PEG 8000, PEG 10000

PEG 20000, PEG 35000	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
----------------------	--------------------------

Rubidiumchlorid	Merck GmbH, Darmstadt
-----------------	-----------------------

Terbium(III)-chlorid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
----------------------	--------------------------

N, N, N', N'-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
--	------------------------------------

Thulium(III)-chlorid (99,9%)	Sigma Aldrich GmbH, München
------------------------------	-----------------------------

Tricin	Roth GmbH, Karlsruhe
--------	----------------------

Ytterbium(III)-chlorid (99,99%)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
---------------------------------	--------------------------

Alle sonstigen Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p. a. von der Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

6.5 Standards

DNA-Molekulargewichtsmarker

SmartLadder 200 to 10000 bp	Eurogentec Deutschland, Köln
-----------------------------	------------------------------

Anhang

Protein-Molekulargewichtsmarker

Low Range (43kDa-2,3kDa)

Gibco BRL Life Technologies GmbH,
Eggenstein

Low Range (97,4kDa-14,4kDa)

Roche, Mannheim

Broad Range (212kDa-2,3kDa)

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

Protein Molecular Weight Marker
(116kDa-14,4kDa)

MBI Fermentas GmbH, St-Leon-Rot

Kits

Crystal Screen

Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA

Crystal Screen 2

Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA

QuikChangeTM Site-Directed

Mutagenesis Kit

Stratagene GmbH, Heidelberg

QIAprep Spin Plasmid Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QIAprep Plasmid Mini Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QIAfilter Plasmid Midi Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QIAquick Gel Extraktion Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Taq DyeDesoxyTM Terminator Cycle
Sequencing Kit

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

6.6 Geräte

Analysenwaage

Sartorius AG, Göttingen

Badthermostat C1-W5P

Haake Messtechnik GmbH & Co., Karlsruhe

Brutschrank BKE 40

Memmert GmbH & Co. KG, Schwalbach

Chromatographie-Anlagen:

FPLC[®] GP-250 Plus

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

HiLoad[®] System Plus

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Dampfautoklav FVS 1/2

Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz

Druckfiltrations-Rührzellen Amicon

8003, 8050, 8200 und 8400

Millipore GmbH, Eschborn

Anhang

Elektrophoreseapparatur GNA-100	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Elektrophoreseapparatur Mini-Protean II	
Dual Slab Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eppendorf Multipette Typ 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Freiburg
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Fluoridelektrode ISEC 301F	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Fraktionssammler SuperFrac [®]	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Geltrockner Model 543	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hochdrucksterilisator Getinge 44EN	Getinge AB, Getinge, Schweden
Inkubationsschüttler Gyrotory [®] G76	New Brunswick Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Inkubationsschüttler Multitron [®]	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Kamera Polaroid MP4+	Bachofer GmbH, Reutlingen
Kühlthermostat F6-C25	Haake Messtechnik GmbH & Co., Karlsruhe
Linbro [®] Tissue Culture multi-well plate	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio
Membranpumpe MZ 2 C Synchro	Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim
Mikrowellengerät R-3V11(W)	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Minischüttler MS1	Bender & Hobein AG, München
Netzgeräte:	
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Consort E554	Bachofer GmbH, Reutlingen
NMR-Geräte	
DMX600 / 800	Bruker GmbH, Rheinstetten
PCR-Gerät DNA Engine PTC-200	MJ Research Inc., Watertown, MA, USA
pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
pH/Ion-Meter pHM 240	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
pH-Stat-Apparatur	
Motorbürette ABU 91	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
VIT 90 Videotitrator	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Schüttelgerät Promax 2020	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Silikonisierte Glasplättchen	Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA
Spektralphotometer U-1100	Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

Anhang

Spektralphotometer Cary 3	Varian Ltd., Mulgrave, Victoria, Australien
Sterilwerkbank Danlaf VFX 1206	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Sublimator Vaco 10	Zirbus GmbH, Osterode
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Ultraschallhomogenisator Labsonic® U	
mit Schwingsonden 5 T und 40 T	B. Braun Biotech GmbH, Melsungen
UV Detektoren UV-M und UV-MII	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV-Transilluminator	Renner GmbH, Dannstadt
Vakuumzentrifuge Speed-Vac	Bachofer GmbH, Reutlingen
Vortex Mixer	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
XRL-multi-well plate	Molecular Dimensions Ltd., Cambridgeshire, England
Zentrifugen:	
Biofuge RS 28 mit Rotor 3746	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
RC-5B mit Rotoren SS34 und GS3	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
RC 28S mit Rotoren SS34, GSA	
und GS3	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

6.7 Säulen- und Chromatographiematerialien

Chromatographie-Leersäulen	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ni-NTA Superflow	Qiagen GmbH, Hilden
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen GmbH, Hilden
HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Resource Q (6ml)	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Q-Sepharose HP Material	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superloop, 50 ml	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

6.8 Sonstiges Material

Dialyseschlauch Spectra/Por 3, Ausschlußgröße: 3,5 kDa	Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, CA, USA
Einmalspritzen, 1 ml, 5 ml, 20 ml und 50 ml Einwegkonzentratoren Vivaspin 4 ml und 16 ml (MWCO: 5 oder 10kDa)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Millipore GmbH, Eschborn
Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml Gefrier Röhrchen	Greiner & Söhne GmbH und Co. KG, Nürtingen Nalge Company, Rochester, NY, USA
Membranfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen
NMR-Probenröhrchen, Ø = 5 mm	Wilma-Labglas, Buena, NJ, USA
Partikel-Separator Micropure™, 0,22 µm	Millipore GmbH, Eschborn
Petrischalen aus Polystyrol, Ø = 94 mm	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Pipetten-Spitzen:	
gelb (5-200 µl), blau (200-1000 µl)	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
weiß (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Polypropylenröhrchen, 13 ml	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
PVDF-Membran (Immobilon P)	Millipore GmbH, Eschborn
Shigemi-NMR-Röhrchen, Ø = 4,2 mm	Shigemi Co., Tokyo, Japan
Sterilfilterhalter, 0,2 µm und 0,45 µm	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Ultrafiltrationsmembranen YM10	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifugenbecher aus Polypropylen für Sorvall-Rotoren SS34, GSA und GS3	Nalge Company, Rochester, NY, USA

6.9 Antibiotika, Medien und Puffer

6.9.1 Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin: 200 mg/ml in H₂O_{milli}

6.9.2 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

S.O.C.-Medium

20 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
5 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl

Medium 20 min autoklavieren und anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

10 ml/l	2 M Glucose
10 ml/l	1 M MgCl ₂ / 1 M MgSO ₄

LB-Medium (Lurie-Bertani-Medium)

10 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
5 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
10 g/l	NaCl

für LB-Agarplatten:

15 g/l	Agar-Agar
--------	-----------

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und anschließend 20 min autoklavieren

TB-Medium (Terrific-Broth-Medium)

12 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
24 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
4 ml/l	Glycerin

Medium 20 min autoklavieren und anschließend folgende sterile Lösung zugeben:

100 ml/l	0,17 M KH ₂ PO ₄ / 0,72 M K ₂ HPO ₄
----------	---

M9-Medium (Glucose-Minimalmedium)

6 g/l Na_2HPO_4

3 g/l KH_2PO_4

0,5 g/l NaCl

1 g/l NH_4Cl

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und 20 min autoklavieren; anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

1 ml/l 1 M MgSO_4

1 ml/l 1 M CaCl_2 , 0,1 M FeCl_3

0,1 ml/l 20 mg/ml Thiaminhydrochlorid

17,5 ml/l 20% (w/v) Glucose

6.9.3 Medien für die Anreicherung mit ^2H , ^{13}C und/oder ^{15}N

^{15}N -Medium

6 g/l Na_2HPO_4

3 g/l KH_2PO_4

0,5 g/l NaCl

1 g/l $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und 20 min autoklavieren; anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

1 ml/l 1 M MgSO_4

1 ml/l 1 M CaCl_2 , 0,1 M FeCl_3

0,1 ml/l 20 mg/ml Thiaminhydrochlorid

5 ml/l 50% (v/v) Glycerin

5 ml/l 20% (w/v) Glucose

$^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -H₂O-Medium

100 ml/l Bioexpress DCN (10x Konzentrat)

mit H₂O auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.

Anhang

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Medium

6 g/l Na_2HPO_4

3 g/l KH_2PO_4

0,5 g/l NaCl

1 g/l $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und 20 min autoklavieren; anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

1 ml/l 1 M MgSO_4

1 ml/l 1 M CaCl_2 / 0,1 M FeCl_3

0,1 ml/l 20 mg/ml Thiaminhydrochlorid

5 ml/l 50% (v/v) $^{13}\text{C}_3$ -Glycerin (99% ^{13}C)

5 ml/l 20% (w/v) $^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose (98-99% ^{13}C)

6.9.4 Puffer

G150-Puffer

2 mM CaCl_2

10 mM 10 mM Tris

pH-Wert mit HCl auf 7,5 einstellen.

SDS Laufpuffer (TGS-Laufpuffer)

5 g Tris

14,5 g Glycin

1 g SDS

in 900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$ lösen, pH-Wert mit HCl auf 8,5 einstellen, auf 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$ auffüllen.

BN-PAGE - Kathodenpuffer

50 mM Tricin

15 mM Bis – Tris / HCl

pH-Wert auf 7,0 einstellen und 20 min autoklavieren. Vor Gebrauch 0,005% Commassie Blue G 250 zugeben.

Anhang

BN-PAGE – Anodenpuffer

5 mM Bis – Tris / HCl

pH-Wert auf 7,0 einstellen und 20 min autoklavieren.

BN-PAGE – Gelpuffer

1,5 M 6-Aminocaproat

150 mM Bis – Tris / HCl

pH-Wert auf 7,0 einstellen und sterilfiltrieren.

Eichpuffer für die Fluorid-Elektrode: 10^{-5} M NaF

0,2 ml 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$, pH 7,5

0,5 ml absolutes Ethanol

4,295 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$

5 μl 10^{-2} M NaF

Eichpuffer für die Fluorid-Elektrode: 5×10^{-3} M NaF

0,2 ml 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$, pH 7,5

0,5 ml absolutes Ethanol

1,8 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{milli}}$

2,5 ml 10^{-2} M NaF

Lebenslauf

Zur Person

Evdokia Katsemi

geb. am 25.08.1975 in Athen, Griechenland

Schullaufbahn

09/1981 – 06/1987 Grundschule in Volos, Griechenland

09/1987 – 06/1990 Gymnasium in Volos, Griechenland

09/1990 – 06/1993 Lyzeum in Volos, Griechenland

06/1993: Abitur

Universitätslaufbahn

10/1994 – 06/1999: Studium in Biologie an der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main

09/1996: Diplom-Vorprüfung

10/1998: Diplom-Hauptprüfung

11/1998 – 06/1999: Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Schmalzing

02/2000 – heute: Promotion am Institut für Biophysikalische Chemie der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Berufserfahrung

04/2000 – 04/2003: wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biophysikalische Chemie der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main; Betreuung des Praktikums "Physikalische Chemie für Biochemiker und Biologen"

Meine akademischen Lehrer waren:

J. Bereiter-Hahn, A. Starzinski-Powitz, K.-D. Entian, J. Feierabend, W. Gnatzy, A. Kröger, L. Nover, R. Prinziger, J. Soppa, W. Wiltshko, H. Zimmermann, J. W. Engels, E. Mutschler, W. Müller, H. Fasold, B. Ludwig, H. Rüterjans.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Evdokia Katsemi, geboren am 25.08.1975 in Athen, Griechenland, daß ich die vorgelegte Dissertation über "Funktionelle und Strukturelle Untersuchungen an der Diisopropylfluorophosphatase aus *L. vulgaris*" selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe. Ich erkläre weiterhin, daß Entlehnungen aus Schriften, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 15. Oktober 2003

Evdokia Katsemi